

Formation einer Katarakt bei Mäusen unter Allgemeinanästhesie: Untersuchung von  
Einflussfaktoren und möglichen Präventionsmethoden

Von: Jenny Klausmann



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Formation einer Katarakt bei Mäusen unter Allgemeinanästhesie: Untersuchung von  
Einflussfaktoren und möglichen Präventionsmethoden

von: Jenny Klausmann

aus: Schwörstadt

München 2023



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt in: F. Hoffmann - La Roche Ltd, Basel

Mentor: Dr. Nora Denk



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 11.Februar 2023



*Meiner Familie, die mich immer unterstützt*



## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1. Die Linse .....	3
2.1.1. Lage und Richtungsbezeichnung .....	3
2.1.2. Transparenz der Linse .....	4
2.2. Die Katarakt.....	8
2.2.1. Definition .....	8
2.2.2. Detektion .....	8
2.2.3. Kategorisierung .....	15
2.3. Katarakt anästhesierter Mäuse .....	16
2.3.1. Besonderheiten des Mausauges.....	16
2.3.2. Notwendigkeit der Allgemeinanästhesie.....	17
2.3.3. Theorien zur Ätiologie und Pathogenese .....	17
2.3.4. Verlauf.....	22
2.3.5. Reversibilität .....	22
2.3.6. Beeinflussende Faktoren .....	23
2.3.7. Histologie .....	25
2.3.8. Weitere Spezies mit Kataraktformation unter Allgemeinanästhesie.....	26
2.3.9. Limitationen bisheriger Literatur .....	26
2.4. Zielsetzung, Fragestellung und Hypothesen .....	27
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1. Material .....	29
3.1.1. Versuchstiere .....	29
3.2. Methoden .....	30
3.2.1. Gruppeneinteilung .....	30
3.2.2. Allgemeine Versuchsdurchführung.....	31
3.2.3. Variation verschiedener Versuchsbedingungen .....	34
3.2.4. Verfahren nach der Allgemeinanästhesie.....	40
3.2.5. Beurteilung der Befunde der ophthalmologischen Untersuchungen.....	41
3.3. Statistik .....	45
3.3.1. Datenerfassung .....	45
3.3.2. Datenanalyse .....	45

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1. Versuchstiere .....	49
4.2. Gruppenübergreifende Befunde .....	50
4.2.1. Verlauf während der Allgemeinanästhesie .....	50
4.2.2. Verlauf nach Beenden der Allgemeinanästhesie .....	51
4.3. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen .....	52
4.3.1. Versuchsteil 1: Verschiedene Cornea-Befeuchtungsprotokolle .....	52
4.3.2. Wahl des Corneabefeuchtungsprotokolls für Versuchsteil 2 .....	67
4.3.3. Versuchsteil 2: Variation weiterer Versuchsbedingungen .....	68
4.3.4. Einfluss des Geschlechtes .....	79
4.3.5. Unterschiede der Katarakt nach Beenden der Anästhesie .....	79
4.3.6. Statistische Auswertung .....	81
4.4. Korrelation der Ergebnisse .....	84
4.4.1. Untersuchungs- und Auswertungsmethoden .....	84
4.4.2. Kataraktformation und Linsendurchmesser .....	84
4.4.3. Kataraktformation und Augenkammertiefe .....	84
4.4.4. Kataraktformation und Corneadicke .....	85
4.4.5. Kataraktformation und Mydriasis .....	85
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>87</b>
5.1. Methoden .....	87
5.1.1. Ophthalmologische Untersuchung und Befundauswertung .....	87
5.1.2. Auswahl verschiedener Versuchsbedingungen .....	88
5.2. Ergebnisse .....	90
5.2.1. Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese .....	90
5.2.2. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen während der Anästhesie .....	93
5.2.3. Reversibilität der Katarakt .....	108
5.2.4. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen nach Beenden der Anästhesie .....	110
5.2.5. Korrelation der Ergebnisse .....	111
5.2.6. Betroffene Spezies .....	112
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>117</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>119</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>9. Anhang .....</b>	<b>135</b>
9.1. Anhang 1 .....	135
9.2. Anhang 2 .....	135
9.2.1. Anhang 2.1 .....	136
9.2.2. Anhang 2.2 .....	148
9.3. Anhang 3 .....	150
9.4. Anhang 4: Konkrete p-Werte der statistischen Auswertung .....	153
9.5. Korrelation verschiedener Parameter.....	158
9.5.1. Anhang 5.1 .....	158
9.5.2. Anhang 5.2 .....	160
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>165</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AKfB. *Ausdehnung der Katarakt bei frontaler Betrachtung mittels Spaltlampe*

AUC. *Area under the curve-Werte*

ERG. *Elektroretinogramm*

IRB. *Irisgleich reflektive Bereiche*

Kontrollgruppe. *Gruppe 2 (OD)*

MMF. *Medetomidin-Midazolam-Fentanyl*

OCT. *optical coherence tomography*

OD. *Oculus dexter*

OS. *Oculus sinister*

OU. *Oculus uterque*

SHB. *Sämtliche Hyperreflektive Bereiche*

SS-OCT. *Swept-Source-OCT*

TMS. *Temperaturmanagementsystem*

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

## 1. Einleitung

Bei Mäusen wird während einer Allgemeinanästhesie regelmässig das Auftreten von Linsentrübungen, sogenannter Katarakte, beobachtet (1-4). Vor allem im Bereich der ophthalmologischen Forschung stellt dies ein Problem dar: Morphologische und funktionelle Untersuchungen des Mausauges erfolgen meist unter Allgemeinanästhesie um eine Immobilisation und Stressreduktion der Mäuse sicherzustellen. Jedoch erschwert eine während der Anästhesie auftretende Katarakt aufgrund der verminderten oder gar gänzlich fehlenden Lichtdurchlässigkeit der Linse Untersuchungen des Augenhintergrundes mittels der optischen Kohärenztomographie (Englisch: optical coherence tomography = OCT) (5) oder Elektroretinographie (= ERG) (6). Beeinflussungen der Qualität oder gar ein vollständiger Ausfall von Daten einzelner Tiere sowie Fehlinterpretationen von Befunden im Falle einer nicht detektierten Kataraktformation sind folglich denkbar.

Bisherige Studien untersuchten als potentielle Ursache der Katarakt die verabreichten Anästhetika (2) und deren Nebenwirkungen in Form einer anästhesiebedingten Corneaoberflächenaustrcknung (7) oder Hypothermie (8). Viele Wissenschaftler diskutieren die daraus hervorgehenden Theorien der Kataraktentstehung. Jedoch sind signifikante Schwachstellen dieser Studien zu erkennen: Viele der Erkenntnisse basieren auf obsoleten oder extrem experimentellen Bedingungen wie dem Einsatz heutzutage nicht mehr empfohlener Anästhetika (7), sehr tiefen Umgebungstemperaturen (8) oder einer Austrocknung der Corneaoberfläche (2). Zudem fokussieren sich sowohl ältere als auch neuere Studien auf die Untersuchung einzelner potentiell beeinflussender Faktoren und lassen einen gleichzeitigen Einfluss weiterer Parameter ausser Acht (2, 8, 9).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kataraktformation anästhesierter Mäuse unter heutzutage praktisch üblichen Versuchsbedingungen. Durch eine Variation beziehungsweise ein Refinement (= Verbesserung) verschiedener Versuchsmethoden sollen potentiell beeinflussende Faktoren oder gar präventive Massnahmen evaluiert und vergleichend untersucht werden. Im Sinne des 3R Konzeptes nach Russel et al (10) (= Replace, Reduce, Refine) könnten die Ergebnisse dieser Arbeit zur Verbesserung der Tiergesundheit beitragen.



## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Die Linse

#### 2.1.1. Lage und Richtungsbezeichnung

Die Linse befindet sich zentral mitten im Augapfel zwischen dem anterioren (= vorderen) und posterioren (= hinteren) Segment des Auges (11). Das anteriore Segment umfasst die Hornhaut (= Cornea), die vordere Augenkammer, Iris, Pupille und die hintere Augenkammer bis zur vorderen Linsenkapsel. Das posteriore Segment erstreckt sich von der hinteren Linsenkapsel über den Glaskörper (= Vitreous), die Netzhaut (= Retina) und Aderhaut (= Choroidea) bishin zur Lederhaut (= Sklera) (11). Die Linse ist umgeben von Augenkammerwasser (= Aqueous humor) auf der anterioren und Glaskörperflüssigkeit (= Vitreous humor) auf der posterioren Seite (11).

Die Position der Linse im Auge wird mithilfe von unelastischen Mikrofibrillen, den sogenannten Zonularfasern, befestigt. Diese verbinden das Ziliarkörperepithel mit dem equatorialen Bereich der Linse (12). Letzterer befindet sich zirkulär zwischen der anterioren und posterioren Linsenfläche (13, 14). Das Zentrum der anterioren Linsenfläche wird als anteriorer Linsenpol, das der posterioren Fläche als posteriorer Linsenpol bezeichnet (15).

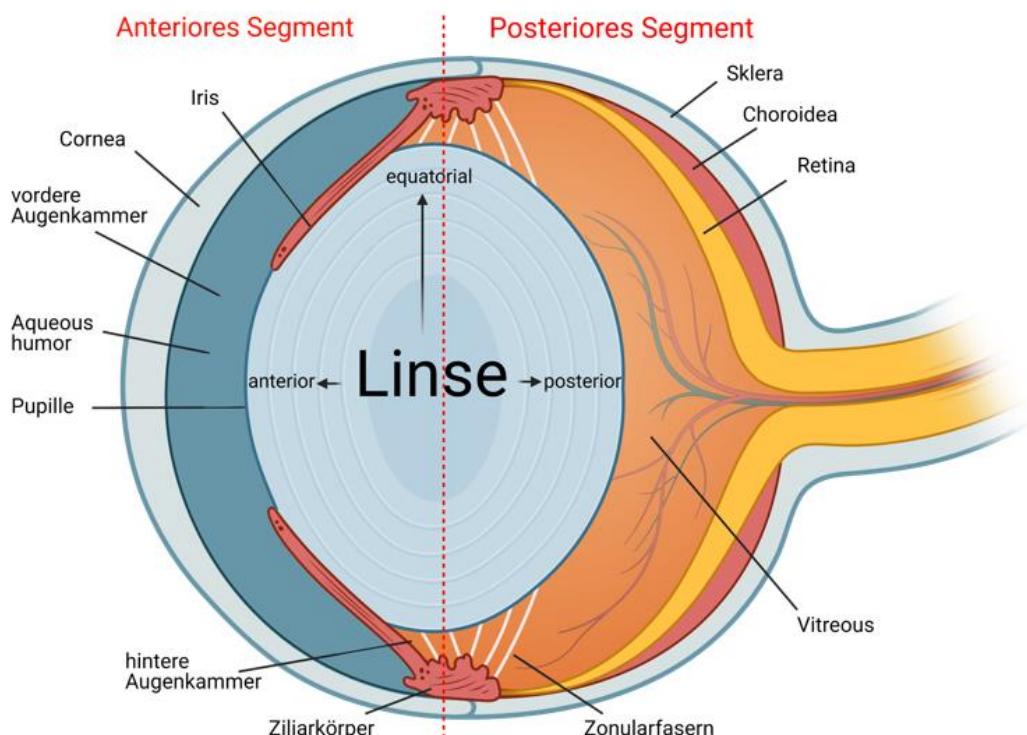


Abbildung 1: Anatomie Mausauge (kreiert mit BioRender.com (16) und

**modifiziert mit Paint 3D (17))****2.1.2. Transparenz der Linse**

Die Transparenz der Linse ist ausschlaggebend für die Sehkraft des Auges (12). Sie ist abhängig von der Minimierung der Streuung und Absorption der die Linse durchdringenden Lichtstrahlen (12, 18), sowie einheitlichen Lichtbrechungsindizes innerhalb des Linsengewebes (18).

Die folgenden Eigenschaften der Linse gewährleisten deren Transparenz: die Anordnung und Form der Linsenzellen/-fasern, die zytoplasmatische Proteinlösung der Linsenzellen/-fasern, der dehydrierte Status des Linsengewebes, die Zellorganellreduktion reifer Linsenfasern, die Avaskularität und Antioxidantien der Linse (12, 19).

**Anordnung und Form der Linsenzellen/-fasern:**

Die Linse lässt sich in eine umgebende Kapsel, eine anteriore Epithelzellschicht und Linsenfasern gliedern (13).

Anterior-equatorial befindliche, kuboidale Epithelzellen (= Germinative Zone) proliferieren im Laufe ihrer Entwicklung, werden kolumnar und differenzieren sich in die sekundären Linsenfaserzellen (20, 21). Nach der vollständigen Elongation und Transformation der Zellen in Linsenfasern treffen diese am anterioren beziehungsweise posterioren Linsenpol aufeinander. Dies wird in Form eines anterior y-förmigen, posterior umgekehrt-y-förmigen Musters sichtbar, den sogenannten anterioren/posterioren Linsennahtlinien (13). Anschliessend bilden die Fasern am apikalen und basalen Ende neue Verbindungen aus und lösen sich von der Linsenkapsel (12, 15). Äusserlich neu gebildetes Gewebe sorgt dafür, dass die reifen Fasern weiter in Richtung des Zentrums der Linse verlagert, konzentrisch angeordnet und durch den Druck von aussen komprimiert werden (12, 15). Folglich erhöht sich die Dichte und Härte der Linse in Richtung des Linsenzentrums und das Linsengewebe kann in eine umgebenden Linsenrinde (= Kortex) und einen innen liegenden Linsenkern (= Nukleus) unterteilt werden (14, 15).

Die aus diesen Prozessen resultierende, gleichmässige, konzentrische Anordnung der Linsenzellen/-fasern mit sehr schmalen extrazellulären Spalträumen und die einheitliche Form der Fasern ermöglicht die Minimierung der Lichtstreuung zwischen den Linsenzellen/-fasern (12).

**Zytoplasmatische Proteinlösung:**

Die Linse besteht aus Wasser (65%), Proteinen (35%) und zu einem geringen Anteil aus Lipiden, anorganischen Ionen, Kohlenhydraten, Ascorbinsäure, Gluthathion und Aminosäuren (22).

Die Proteine werden unterteilt in wasserlösliche Strukturproteine (= Kristalline) und unlösliche, membrangebundene Proteine (= Albumine) (15, 22). Der Anteil der Kristalline überwiegt jenen der Albumine, wobei konkrete Prozentsätze in Abhängigkeit der Spezies, des Tieralters und des pathophysiologischen Status der Linse variieren können (15, 22). Primär werden die Kristalline der zytoplasmatischen Proteinlösung als ausschlaggebend für die Transparenz der Linse genannt (12, 19).

Die Kristalline werden unterteilt in Alphakristalline und Beta-/Gammakristalline (19). Alphakristalline übernehmen eine vor einer Proteinaggregation schützende Aufgabe (sogenannte Chaperone Funktion) (19, 23). Da die Proteine in den reifen Linsenfasern nicht ersetzt oder erneuert werden, ist der lebenslange Schutz und Erhalt der naiven Proteinstruktur durch Vermeidung einer Proteinaggregation für das Bestehen der Löslichkeit der Kristalline ausschlaggebend (12, 19). Beta- und Gammakristalline haben aufgrund einer 30%igen Sequenzähnlichkeit in den zentralen Domänen eine ähnliche Tertiärstruktur und werden daher als Superfamilie zusammengefasst (19, 24). Ihre spezifische Struktur ist hoch stabil und trägt ebenfalls zur Vermeidung einer Aggregation der Proteine bei (19).

Die Aufrechterhaltung der naiven Proteinstruktur und der somit ermöglichten hohen Dichte der im Zytosol reifer Linsenfasern gelösten Kristalline - über eine Strecke, welche annähernd der Wellenlänge des durchdringenden Lichtstrahls entspricht - trägt schliesslich zu einem konstanten Lichtbrechungsindex der Linsenfasern und zur Transparenz der Linse bei (19).

#### Dehydrierter Status des Linsengewebes:

Die Form und Anordnung der Linsenzellen und -fasern und die Dichte der Proteinlösung kann durch die Regulation des Zellvolumens beziehungsweise des Flüssigkeits- und Ionenhaushaltes der Linse beeinflusst werden (25). Daher stellt der physiologisch dehydrierte Status des Linsengewebes (Wassergehalt von 65-70% (22)) sekundär einen entscheidenden Faktor für die Transparenz der Linse dar. Der dehydrierte Status wird mithilfe elektrochemischer und osmotischer Gradienten und dem Ionenhaushalt der Linse ermöglicht: Die Linsenkapsel und Zell-/Fasermembranen sind impermeabel für grosse Moleküle wie Albumin und

Globulin, jedoch permeabel für Wasser und Ionen (15). Im physiologischen Zustand liegt aufgrund eines elektrochemischen Gradienten ein Einstrom von Natriumionen in die parazellulären Spalträume des Linsengewebes vor (26). Wasser folgt diesem Natriumeinstrom infolge eines osmotischen Gradienten (26). Über membranständige Transportkanäle werden die Ionen und Wasser ins Innere der Linsenfasern aufgenommen (19, 26). Verbindungen zu benachbarten Faserzellen über Gap junctions ermöglichen anschliessend eine transzelluläre Diffusion in Richtung des Lisenepithels (26). Dort werden mit Hilfe der Natrium-Kalium-ATPase aktiv Kaliumionen und Aminosäuren in das Linsengewebe aufgenommen und Natriumionen ausgeschleust. Diesem Austausch folgt eine osmotisch-bedingte Diffusion von Chloridionen und Wasser aus dem Linsengewebe in das Augenkammerwasser (19). Da die Konzentration der Natrium-Kalium-ATPase im equatorialen Lisenbereich vergleichsweise höher ist, resultiert eine Zirkulation der Ionen und Flüssigkeit in Form eines Einstroms am anterioren/posterioren Lisenpol und eines Ausstroms nahe des Lisenequators (26). Während innerhalb des Linsengewebes ein geringer Natrium-/Chlorid- und Wassergehalt, sowie ein hoher Kaliumgehalt resultiert, liegen ausserhalb im Augenkammerwasser gegenteilige Verhältnisse vor (22). Ebenfalls bedeutsam für den dehydrierten Status ist der Calciumhaushalt der Linse. Dem konzentrationsbedingt passiven Calciumeinstrom über Calciumkanäle stehen Calcium-ATPasen in den Zellorganellmembranen, sowie die Möglichkeit Calcium an Beta-/Gammakristalline zu binden, entgegen (12, 27). Im physiologischen Zustand ist der Calciumgehalt intrazellulär deutlich geringer als extrazellulär (27). Calcium dient als intrazelluläres Signal, das Zelfunktionen wie die Permeabilität der Zellmembran reguliert (27) und anhand dessen den Flüssigkeitshaushalt der Linse beeinflussen kann.

Der aus diesen Prozessen resultierende, relativ dehydrierte Status der Linse wird als dynamisch betrachtet (26, 28).

#### Zellorganellreduktion:

Variierende Verhältnisse und Konzentrationen von Lipiden und organischen Molekülen können den spezifischen Lichtbrechungsindex lebender Zellen beeinflussen (18). Zellorganellen besitzen einen hohen Lipidgehalt und im Vergleich zum umgebenden Zytoplasma einen erhöhten Brechungsindex (18).

Im Verlauf des Reifungsprozesses verlieren die Linsenfasern den Zellkern,

Ribosomen, den Golgi-Apparat, das Endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien, was ermöglicht zell- und faserninterne Brechungsindizes zu minimieren (18, 29, 30).

In den jüngeren Zellen der equatorialen, proliferativen Zone oder der anterioren Epithelzellschicht sind allerdings sämtliche Zellorganellen zu finden, wenn auch in geringer Dichte verglichen mit Zellen anderer Gewebe (18, 29). Somit resultiert eine Differenz der Brechungsindizes zwischen den Epithelzellen und reifen Linsenfasern. Bassnet et al (18) vermuten, dass diese Differenz vernachlässigt werden kann, da die Differenz der Lichtstreuung proportional zur Weglänge und die anteriore Epithelzellschicht sehr dünn ist.

Erhaltene Zellorganellen reifer Fasern wie die Plasmamembran und das Zytoskelett ähneln in ihrem Brechungsindex dem des Zytoplasmas, weshalb sie keine gesteigerte Lichtstreuung zur Folge haben (31). Die Plasmamembran und das Zytoskelett sind verantwortlich für die Zellstruktur und -form. Das Zytoskelett besteht aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten, Vimentin, Spektrin und linsenspezifischen Intermediärfilamenten (=Filensin und Phakinin) (12, 22). Die perlafadenförmigen Intermediärfilamente gewährleisten die Packung, Dichtevertteilung und Befestigung von Proteinen (22). Der Erhalt dieser Organellen trägt aufgrund der Gewährleistung der Zell-/Faserform und Proteinanordnung somit ebenso wie die Reduktion der zuvor genannten Zellorganellen- zur Transparenz der Linse bei.

#### Avaskularität und Antioxidantien der Linse:

Die Linse besitzt keine direkt versorgenden Blutgefäße, weshalb eine Beeinflussung der Lichtdurchlässigkeit beziehungsweise Lichtstreuung durch nicht-transparente Arterien und Venen ausbleibt (12).

Des Weiteren resultiert aufgrund der fehlenden direkten Blutversorgung ein geringer Gehalt an molekularem Sauerstoff im und um das Linsengewebe (12, 32). Gemeinsam mit reichlich vorhandenen reduzierenden Substanzen (=Antioxidantien) sorgt dies für den Schutz vor oxidativen Zellschäden, wie sie infolge einer Modifikation der Struktur von Linsenproteinen oder der DNA der Zellen durch freie Radikale entstehen können (12, 28) und trägt damit zum Erhalt der Linsentransparenz bei. Ein Beispiel für ein nicht-enzymatisches Antioxidanz ist Glutathion, welches freie Radikale im Linsengewebe auffängt (22, 33). Glutathion stellt zudem Sulfhydrylgruppen bereit, welche die Löslichkeit der Linsenproteine

und die Aufrechterhaltung der Transportfunktion der Natrium-Kalium-ATPase unterstützen (22, 33).

## **2.2. Die Katarakt**

### **2.2.1. Definition**

Eine Katarakt ist per Definition ein Verlust der Transparenz einzelner Linsenabschnitte oder der gesamten Linse (15, 34). Aufgrund von Veränderungen des Lichtbrechungsindex einzelner oder mehrerer Linsenfasern, sowie einer vermehrten Streuung und Absorption des auf die Linse treffenden Lichtstrahls resultiert ein getrübtes Erscheinungsbild des Gewebes (12).

### **2.2.2. Detektion**

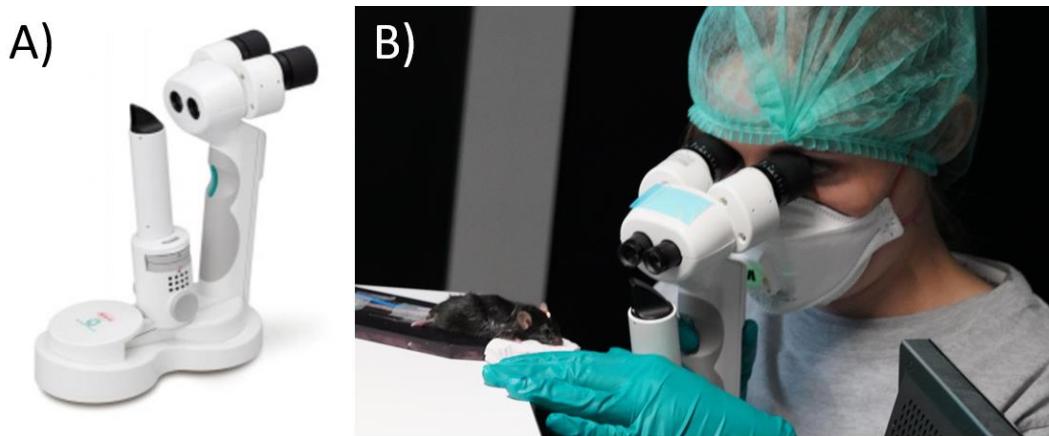
Um eine Katarakt erkennen und genauer charakterisieren zu können, können *in vivo* sowie *ex vivo* verschiedene Untersuchungsmethoden genutzt werden. Im Folgenden werden gängige und für die vorliegende Arbeit relevante Untersuchungsmethoden erläutert.

#### **2.2.2.1. Untersuchungsmethoden *in vivo***

##### **2.2.2.1.1. Spaltlampenuntersuchung**

Die Spaltlampenuntersuchung gilt als routinemässig eingesetzte Methode um die Linse, sowie die Augenlider, den Tränenfilm, die Konjunktiven, Cornea, Augenkammer und Kammerwasser, die Iris und den vorderen Glaskörper zu untersuchen und pathologische Veränderungen, wie eine Katarakt, zu detektieren (35).

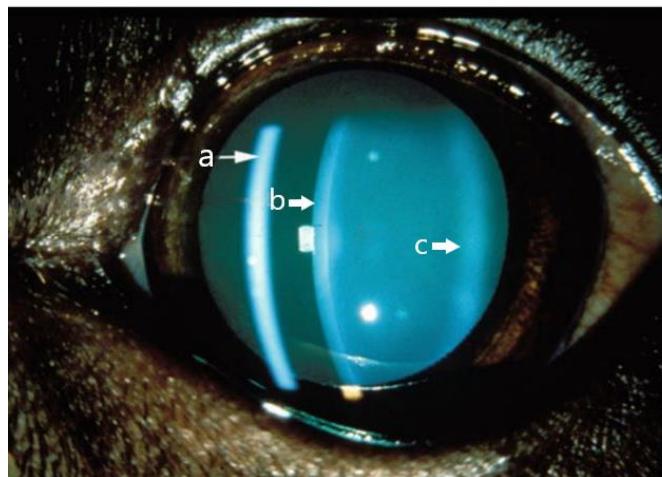
Die Abbildung 2 zeigt eine portable Handspaltlampe und die Durchführung einer Spaltlampenuntersuchung an einer anästhesierten Maus. Für eine vollständige Beurteilung der Linse ist vor Beginn der Untersuchung eine topikale Applikation von Mydriatika zur Dilatation der Pupille notwendig (35).



**Abbildung 2: A) Portable Handspaltlampe (Kowa Modell SL-17, Kowa Europe GmbH, Düsseldorf, Germany) (36), B) Spaltlampenuntersuchung an einer anästhesierten Maus durchgeführt von Jenny Klausmann (Bild entstand im Rahmen der vorliegenden Arbeit)**

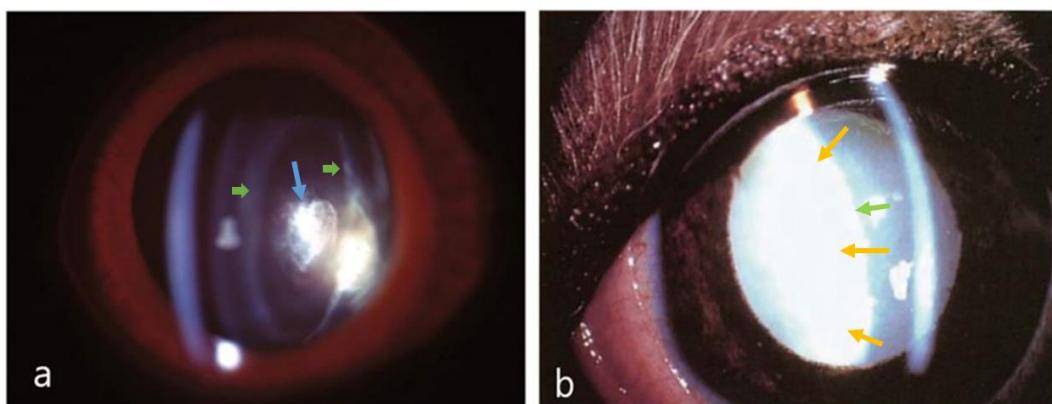
Die Beleuchtungseinheit der Spaltlampe generiert ein Licht, welches in der Intensität, Form (diffuser Lichtkegel oder präzise fokussierter Strahl mit variierender Breite und Länge) und Farbe (weiss, blau oder rot-frei) verändert werden kann (35). Die Kombination des Lichtstrahls mit dem Mikroskop der Spaltlampe ermöglicht *in vivo* die stereoskopische Betrachtung eines präzise beleuchteten und stark vergrösserten optischen Schnittbildes durch die transparenten und transluzenten Gewebestrukturen des Auges (= Abbildung 3) (37, 38).

Bei direkter Beleuchtung wird der einfallende Lichtstrahl auf drei Ebenen reflektiert: 1. Eine konvexe Reflexion der Corneaoberfläche (Abbildung 3, markiert mit a), 2. Eine konvexe Reflexion der Iris und anterioren Linsenkapsel (Abbildung 3, markiert mit b), 3. Eine konkave Reflexion der posterioren Linsenkapsel (Abbildung 3, markiert mit c) (39). Die Scharfstellung dieser Ebenen erfolgt mittels Variation des Abstandes der Spaltlampe zum Auge des untersuchten Tieres. Beschreibungen der Linsennähte als sichtbare dünne Linien, sowie der Linsenrinde/des Lisenkerns als diffus dunkler Bereich mit opalisierenden Lichtblöcken - produziert von diskontinuierlichen Oberflächen der internen Lisenarchitektur (= zwischen anteriorer/posteriorer Lisenrinde und anteriorer/posteriorer adultem, fetalem, embryonalem Kern) – (28, 39) und der Augenkammer beziehungsweise des Glaskörpers als diffus dunkler Bereich treffen erfahrungsgemäss auch auf die Lisen von Mäusen zu.



**Abbildung 3:** Optisches Schnittbild einer Spaltlampenuntersuchung, Lichtstrahl von links nach rechts mit Fokus auf der anterioren Linsenkapsel, a = konvexe Reflektion der Cornea, b = konvexe Reflektion der anterioren Linsenkapsel, c = konkave Reflektion der posterioren Linsenkapsel, Zwischen a + b = Augenkammer mit Kammerwasser, Zwischen b und c: Linsenrinde und Linsenkern, rechts von c = anteriorer Abschnitt Glaskörper; Bild entnommen aus Wilkie et al (40) und modifiziert via Paint (17) von Jenny Klausmann

Eine Katarakt äussert sich im Rahmen der Spaltlampenuntersuchung in Form einer gräulich-weisslichen Reflektion der Lichtstrahlen beziehungsweise Trübung zwischen der anterioren und posterioren Linsenkapsel (39). Letztere kann, in Abhängigkeit der Ausdehnung der Trübung, nicht mehr sichtbar sein (Abbildung 4). Die Bestimmung der Position von Pathologien durch die Relation zu den 3 physiologischen Lichtreflexen stellt eine der Besonderheiten der Spaltlampenuntersuchung dar (35). Durch einen grösseren Winkel zwischen Spaltleuchteneinrichtung und Mikroskopachse wird das Schnittbild verbreitert, was zur Bestimmung der Ausdehnung von pathologischen Veränderungen innerhalb von Gewebestrukturen beitragen kann (38).



**Abbildung 4:** Spaltlampenuntersuchung mit Katarakt, a) fokale Katarakt (blauer Pfeil) zwischen der anterioren und posterioren Linsenkapsel (grüne Pfeile), b) diffuse Katarakt (orangene Pfeile), anteriore Linsenkapsel (grüner

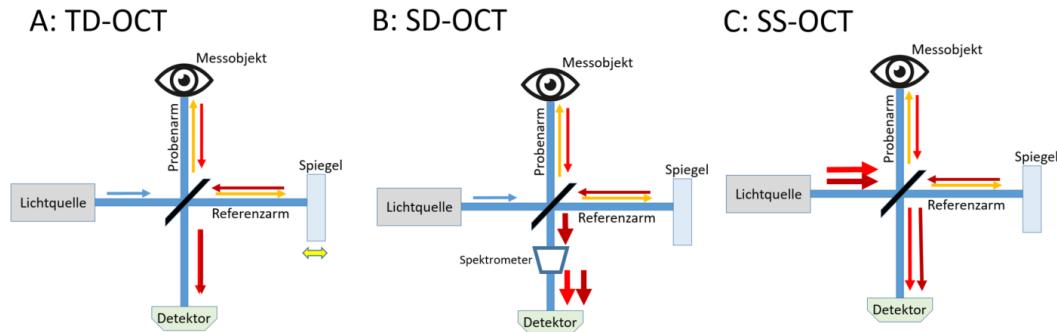
**Pfeil, posteriore Linsenkapsel nicht erkennbar, a entnommen aus Wilkie et al (40), b entnommen aus Davidson et al (39), beides modifiziert von Jenny Klausmann**

Zusammenfassend können mit Hilfe der Spaltlampenuntersuchung verschiedene anatomische Strukturen des Auges und Pathologien wie die Katarakt *in vivo* präzise und detailliert beschrieben und innerhalb des Gewebes lokalisiert werden, was die Spaltlampenuntersuchung zu einem wichtigen Bestandteil ophthalmologischer Untersuchungen macht.

#### **2.2.2.1.2. Optische Kohärenztomographie**

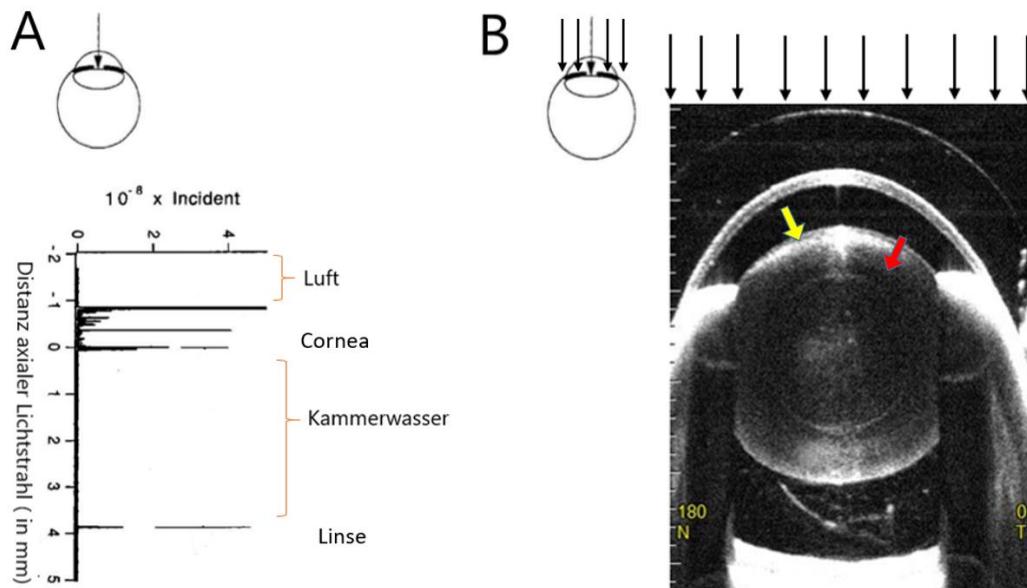
Die Optische Kohärenztomografie (= OCT) ist eine Bildgebungstechnik, welche hochauflösende Querschnittsbilder der Mirkrostruktur von biologischen Systemen erstellt. Ermöglicht wird dies mit Hilfe der Interferometrie: eine Messmethode welche die Überlagerung oder Interferenz von reflektierten Lichtstrahlen eines Probe- und eines Referenzarmes nutzt, um daraus resultierende zeitliche Verzögerungen und variierende Intensitäten der Lichtstrahlen zu messen. Basierend auf der variierenden Intensität reflektierter Lichtstrahlen können tiefenaufgelöste Reflektivitätsprofile erstellt werden (41, 42). Grundsätzlich werden 3 Formen der OCT-Technik - das Time-domain-OCT (= TD-OCT), das Spectral-Domain-OCT (= SD-OCT) und das Swept-Source-OCT (= SS-OCT) - unterschieden (Abbildung 5). Die TD-OCT ist für die Messung der zeitlichen Interferenz zweier Lichtstrahlen darauf angewiesen, dass deren Weglänge nahezu identisch ist (43). Messungen unterschiedlicher Gewebetiefen benötigen daher eine Verstellung der Entfernung des Referenzarmes (43). Bei der SD- und SS-OCT hingegen werden die Interferenzen einzelner spektraler Komponenten und deren jeweiligen Frequenzen gemessen (41-43). Die Vorteile dieser Methoden gegenüber der TD-OCT ist, dass ein fixer Referenzarm einsetzbar ist und die Informationen aller Gewebeschichten zur selben Zeit gemessen werden können. Dies ermöglicht eine erheblich verkürzte Aufnahmedauer, erhöhte A-Scan-Rate (siehe Abbildung 6) und verbesserte axiale Auflösung (41-43). Die SS-OCT ermöglicht gegenüber der SD-OCT durch den Einsatz eines verschieden Wellenlängen nach und nach durchlaufenden Laserstrahls anstelle eines Spektrometers eine noch schnellere Aufnahmegeschwindigkeit, dichtere Scanmuster, eine längere Abbildungsreichweite und verbesserte Eindringtiefe (41-43). Mit einer Eindringtiefe von 13mm und einer Auflösung von 10x30 µm (44) können kommerzielle SS-OCT Geräte wie das CASIA2 (Tomey Corporation Japan, Nagoya,

Japan) eine *in vivo* Untersuchung der gesamten Linse von Mäusen ermöglichen.



**Abbildung 5: Vergleich dreier OCT-Formen, A: TD-OCT mit flexilem Referenzarm, B: SD-OCT mit Spektrometer, C: SS-OCT mit Wellenlängendurchlaufendem-Laser**

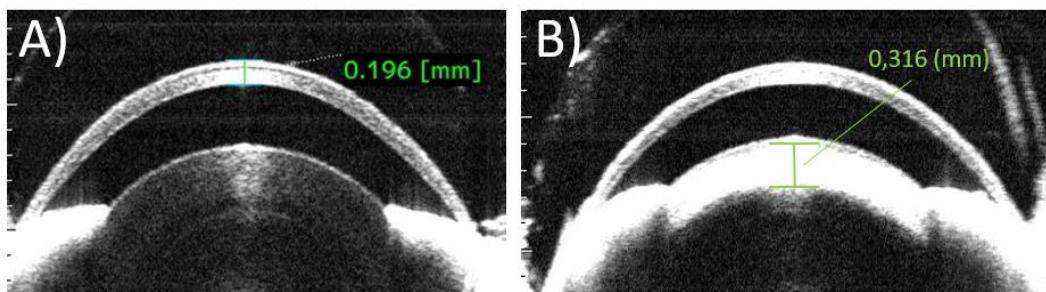
Die Darstellung der OCT-Messungen erfolgt in Form von A- und B-Scans (Abbildung 6): A-Scans sind ein eindimensionales Reflektivitätsprofil entlang der Strahlachse, welche nebeneinander zusammengesetzt ein zweidimensionales Querschnittsbild, den sogenannten B-Scan, ergeben (41, 43). Auf den B-Scans werden die unterschiedlichen Intensitäten der Lichtreflektionen verschiedener Gewebeschichten farb- oder grautonkodiert wiedergegeben (siehe B-Scan Abbildung 6B). Anatomische Strukturen und Pathologien wie die Katarakt werden anhand dieser Farb- oder Grautöne kenntlich gemacht und der Vergleich dieser mit den umliegenden Strukturen führt zu Bezeichnungen als hyper- oder hyporeflektiv. Eine Katarakt äussert sich auf einem OCT B-Scan als hyperreflektives Signal innerhalb des Linsengewebes (9, 45-47).



**Abbildung 6 A) Eindimensionaler A-Scan einer OCT-Aufnahme, Pfeil=axialer Lichtstrahl, entnommen aus Huang et al (48), modifiziert von Jenny Klausmann via Paint (17); B) Zweidimensionaler B-Scan einer OCT-Messung, zusammengesetzt aus mehreren A-Scans (= schwarze Pfeile), Pfeil gelb:**

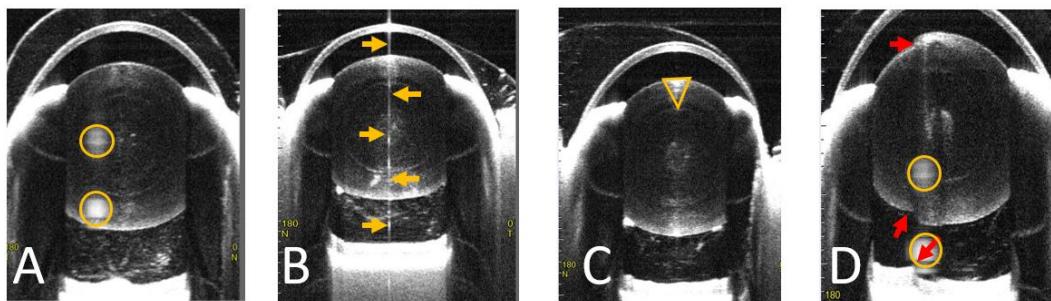
**Hyperreflektive Darstellung der Katarakt, Pfeil Rot: Hyporeflektive Darstellung des Linsengewebes**

Ein Vorteil der OCT ist, dass neben einer deskriptiven, qualitativen Beschreibung der Katarakt, objektive Ausmessungen absoluter Distanzen auf den B-Scans durchgeführt werden können (49) (Abbildung 7). Der Abstand zweier Strukturen und die Grösse hyper- oder hyporeflektiver Bereiche kann somit mikrometergenau bestimmt werden (49). Solche Messungen können eine subjektivere, qualitative Befunderhebung wie die einer Spaltlampenuntersuchung ergänzen (50). Gegenüber weiteren bildgebenden Verfahren wie Ultraschall und Magnetresonantomographie ist ein Vorteil der OCT das Erreichen einer höheren Auflösung (42).



**Abbildung 7: Beispielhafte Ausmessung verschiedener Größen auf einem B-Scan: A) Corneadicke, B) Katarakt**

Bei der Auswertung der B-Scans müssen potentielle Artefakte bedingt durch den Lichtstrahl des Lasers oder Bewegungen beachtet werden (51, 52). Beispiele für Artefakte, welche erfahrungsgemäss bei der Aufnahme von Scans des Mausauges auftreten können, sind in Abbildung 8 dargestellt:



**Abbildung 8: Beispiele verschiedener Artefakte auf B-Scans; A-C) Orange markiert: unterschiedliche Laserreflektions-/Laserstreuungsartefakte, D) Pfeil rot: Bewegungsartefakt (=Bildverschiebung), Kreis orange: Laserartefakt**

Zudem muss beachtet werden, dass in Folge einer Kataraktformation eine vermehrte Lichtstreuung (47, 53) und demzufolge ein Detailverlust von Strukturen posterior der Katarakt auftreten können (53). Bei hochgradiger Lichtstreuung im anterioren Bereich könnten posteriore Veränderungen möglicherweise nicht mehr detektiert werden und Fehlinterpretationen resultieren (53).

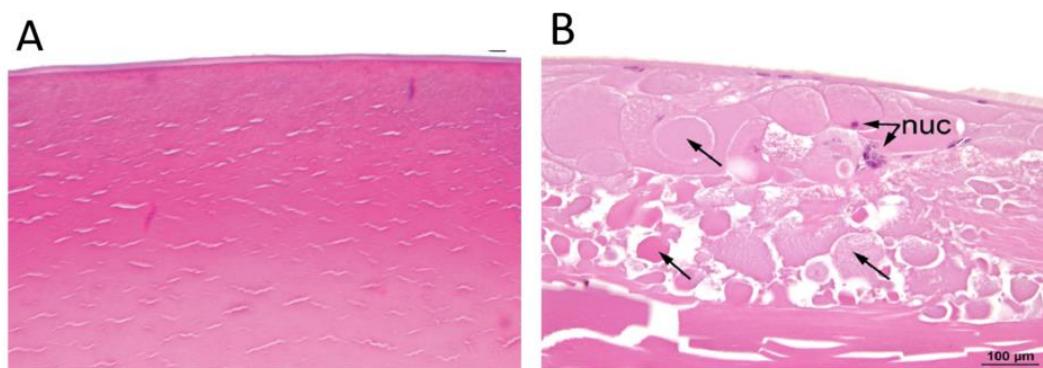
Die Entwicklung einer Katarakt kann zusammenfassend *in vivo* mit Hilfe der OCT detailliert, akut und über ihren zeitlichen Verlauf hinweg bildlich veranschaulicht, dokumentiert und objektiv ausgemessen werden (43, 45, 46).

### 2.2.2.2. Untersuchung *ex vivo*

Eine histologische Untersuchung kann durchgeführt werden, um die Morphologie, Anatomie und Pathologien von Nageraugen in präklinischen Studien zu charakterisieren. Da sie jedoch eine Enukleation des Auges benötigt, erlaubt sie nur eine einmalige Untersuchung und keine langfristige Dokumentation der zeitlichen Entwicklung innerhalb eines Tieres.

Eine Katarakt kann sich im histologischen Schnittbild wie folgt äußern:

Veränderungen der Form, Struktur und Anordnung der Linsenzellen/-fasern können anhand runder, umfangsvermehrter Zellen und Fasern mit graduell degradierten Zellkernen und granulärem Zytoplasma, einer Fragmentation, hyalinen Degeneration, Vakuolisierung und Ausbildung extrazellulärer, flüssigkeitsgefüllter Spalten sichtbar werden (35, 54). Des Weiteren kann eine Hyperplasie des Linsenepithels und Verdickung der Linsenkapsel entstehen (13). Im Zuge der Proliferation des Linsenepithels können Epithelzellen in die posterioren Bereiche der Linse migrieren, weshalb epitheliale Zellkerne in diesem Bereich ebenfalls auf eine Katarakt hinweisen können (13, 35). Eosinophile Globuli (= Morgagnian globuli) stellen eine Proteinansammlung im Zuge der Degeneration der Linsenfasern/-zellen dar und können im Zuge einer Katarakt zunächst strukturlos, mit fortschreitender Entwicklung granulär und schlussendlich als homogene milchige Flüssigkeit auftreten (35, 54). Des Weiteren können Lipidmetamorphosen und Kalzifizierungen im Linsengewebe beobachtet werden (35, 54). Diese Veränderungen werden im Allgemeinen als irreversibel beschrieben (35).



**Abbildung 9:** A) Hämatoxylin Eosin gefärbter Schnitt physiologisches

**Linsengewebe, Bild entnommen aus Newkirk et al (55) B Hämatoxylin Eosin Schnitt einer Katarakt: Linsenfasern (Pfeil) mit verschiedenen abnormalen Eigenschaften wie: Zellschwellung, Separierung, Granularität, Kondensation, Fragmentierung und Verlust der geordneten Anordnung. Bemerkenswert ist die Retention der Linsenfaserkerne mancher Fasern (nuc). Bild entspringt dem U.S. National Toxicology Program (56)**

### **2.2.3. Kategorisierung**

Eine Katarakt kann anhand der anatomischen Lokalisation, des Schweregrades, des Zeitpunktes des Auftretens oder der Ätiologie in verschiedene Kategorien unterteilt werden (15).

#### **2.2.3.1. Lokalisation**

Aufgrund der räumlichen Position innerhalb der Gewebeschichten der Linse wird eine kapsuläre, subkapsuläre, kortikale oder nukleäre Katarakt unterschieden (28, 35).

Gemäss der Richtungsbezeichnungen der Linse können die drei erstgenannten Formen in eine anteriore oder posteriore, sowie equatoriale oder polare Katarakt unterteilt werden (28). Die equatoriale Katarakt kann im superioren, inferioren, paraxialen (= temporalen) oder axialen (= nasalen) Bereich auftreten (28).

#### **2.2.3.2. Schweregrad**

Der Schweregrad der Katarakt kann anhand der Ausbreitung als incipient, immatur, matur oder hypermatur eingestuft werden (35).

Eine incipiente Katarakt involviert per Definition <10% des Linsengewebes (35). Abgesehen von dieser fokalen Trübung ist das Linsengewebe transparent (15).

Eine Trübung des Linsengewebes über 10% und unter 100% entspricht einer immativen Katarakt (15). Die Intensität der Trübung kann in nebeneinanderliegenden Gewebeabschnitten variieren, wodurch zur selben Zeit gering und stark verdichtete Linsenbereiche sowie transparente Linsenfasern erkennbar sein können (57).

Als mature Katarakt wird eine das gesamte Linsengewebe betreffende (= 100%ige) Trübung der Linse bezeichnet (15).

Bei der schwerwiegensten Form, der hypermaturen Katarakt, kann eine Verflüssigung der Linsenbestandteile, sowie eine Proteinolyse beobachtet werden (15, 54). Dieser Prozess beginnt im Kortex der Linse und breitet sich von dort zum Linsenkern aus (15). Das Austreten der degradierten Linsenproteine in die

Umgebung der Linse führt zu einer Reduktion des Linsenvolumens und fältigen Erscheinung der Linsenkapsel (15, 54). Sinkt der Linsenkern im Zuge der Verflüssigung des Kortex und der Schwerkraft nach unten, spricht man auch von einer Morgagnian Katarakt, einer Sonderform der hypermaturen Katarakt (15, 54).

#### **2.2.3.3. Zeitpunkt des Auftretens**

Je nach Zeitpunkt des Auftretens kann die Katarakt als angeboren (=kongenital) oder erworben (=im späteren Lebensabschnitt auftretend) eingeordnet werden (28).

#### **2.2.3.4. Ätiologie**

Eine Katarakt kann in Folge verschiedenster pathologischer Prozesse mit Veränderungen des Lisenmetabolismus - dem Nährstoff-/Protein-/Energiestoffwechsel und dem osmotischen Gleichgewicht - sowie der Mikroarchitektur der Linse hervorgerufen werden (15, 28). Konkret sind genetische Mutationen, systemische Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, virale oder bakterielle Infektionen, Traumata, das zunehmende Alter, Strahlung, freie Radikale, sowie die Verabreichung verschiedener Substanzen mögliche Ursachen für die Ausbildung einer Katarakt (13, 39).

### **2.3. Katarakt anästhesierter Mäuse**

Bei anästhetisierten Mäusen kann regelmässig die Formation einer Katarakt während der Allgemeinanästhesie beobachtet werden (1-4).

#### **2.3.1. Besonderheiten des Mausauge**

Das Mausauge weist einige speziesbedingte, anatomische Besonderheiten auf. Die für diese Arbeit relevanten Besonderheiten sollen an dieser Stelle aufgeführt werden.

Verglichen mit Spezies wie dem Mensch ist die Linse der Maus in Relation zum gesamten Auge sehr gross (75% des Auges) (21). Die relativen Anteile der Augenkammer und des Glaskörpers hingegen sind am Mausauge vergleichsweise kleiner (21). Des Weiteren erscheint die Linse von Mäusen nahezu rund im Vergleich zur eher konvexen Form beim Menschen (21).

Der Literatur können die folgenden, für diese Arbeit relevanten Durchschnittswerte einer Ausmessung des Mausauges entnommen werden: Corneadicke 0,119mm (58) bis 0,137mm (59), Tiefe der Augenkammer 0,4mm (58), Linsendurchmesser

1,86mm (58).

### **2.3.2. Notwendigkeit der Allgemeinanästhesie**

Eine Allgemeinanästhesie ist per Definition durch einen Bewusstseinsverlust, eine Schmerzlosigkeit, eine Unterdrückung der Reflexaktivität und eine Muskelrelaxation gekennzeichnet (60). Stress und Schmerzen der Tiere im Zusammenhang mit verschiedenen Eingriffen und Untersuchungen bei *in vivo* Studien werden im Sinne des Tierschutzes während einer Allgemeinanästhesie verhindert (60, 61). Eine adäquate Immobilisation kann zudem Abwehrbewegungen der Mäuse während ophthalmologischen Untersuchungen verhindern, was erfahrungsgemäss eine präzisere und detailliertere Daten- und Befunderhebung ermöglicht. Des weiteren können Bewegungsartefakte im Zusammenhang mit bildgebenden Verfahren wie der OCT reduziert oder gar vollständig vermieden werden (61).

### **2.3.3. Theorien zur Ätiologie und Pathogenese**

Eine Allgemeinanästhesie kann je nach Indikation mithilfe unterschiedlicher Substanzen und Substanzkombinationen durchgeführt werden (61, 62). Von einer Kataraktformation wurde nach Verabreichung der folgenden Substanzen berichtet: Xylazin-Ketamin (1-3, 5, 47, 53, 63), Avertin (1), Chloralhydrat (7-9, 64), Pentobarbital (65), Sevofluran (4), Isofluran (66) und Tiletamin-Zolazepam-Xylazin (67).

Bisherige Untersuchungen der Katarakt anästhesierter Mäuse führten zu unterschiedlichen Theorien bezüglich der Ursache und deren zugrundeliegenden Pathomechanismen. Die meist diskutierten Hypothesen lassen sich folgenden Kategorien zuordnen:

- Theorien zu wirkstoffspezifischen Mechanismen der Anästhetika (1-5, 7-9, 64)
- Austrocknung der Corneaoberfläche (1, 2, 4, 7, 67)
- Kalte Katarakt (8, 64, 68)

#### **Theorien wirkstoffspezifischen Mechanismen verschiedener Anästhetika:**

Calderone et al (2) konnten eine Kataraktformation nach einer Xylazin-Ketamin-Injektion sowie nach einer alleinigen systemischen und topikalen Verabreichung

von Xylazin, jedoch nicht nach einer alleinigen Injektion von Ketamin feststellten. Sie schlussfolgerten, dass die wirkstoffspezifische Bindung des Xylazins an Alpha-2-Rezeptoren der Linse für die Katarakt verantwortlich sein könnte. Zudem beschreiben sie als potentielle Ursache Nebenwirkungen der Anästhetika infolge einer wirkstoffspezifischen Rezeptor-Interaktion des Xylazins. Allerdings konnten die Autoren die zugrundeliegenden Mechanismen nicht endgültig aufklären. Tkatchenko et al (3) ziehen nach Durchführung einer Xylazin-Ketamin-Anästhesie ebenfalls wirkstoffspezifische Mechanismen in Form einer Ketamin-bedingten Beeinflussung der Aktivierung von Sigma-1-Rezeptoren der Linse als Ursache in Betracht. Eine Kataraktformation nach Verabreichung von Chloralhydrat lässt Viera et al (64) mitunter wirkstoffspezifische, toxische Abbauprodukte des Chloralhydrates als ursächlich diskutieren.

Ridder et al (1) konnten entgegen Calderone et al (2) auch nach alleiniger Injektion von Ketamin eine Katarakt beobachten. Als Grund dieses Widerspruchs vermuten Ridder et al (1) infolge einer deutlich höheren Dosierung des Ketamins das Erreichen eines tieferen Anästhesiestadiums in ihrer Studie und dass die Tiefe der Anästhesie für die Kataraktformation von Bedeutung sei. Des Weiteren konnten Ridder et al (1) nach der Injektion von Avertin eine Katarakt beobachten. Daher kamen die Autoren zu dem Schluss, dass primär die infolge aller verabreichten Anästhetika beobachteten Nebenwirkungen für die Katarakt verantwortlich sind, anstelle einer wirkstoffspezifischen Interaktion aufgrund der chemischen Struktur einzelner Substanzen. Diese These könnte anhand der Studienergebnisse von Li et al (4) unterstützt werden: Sowohl nach intraperitonealer Injektion von Chloralhydrat, als auch inhalativer Verabreichung von Sevofluran konnte eine Katarakt und infolge beider Anästhetika dieselben Nebenwirkungen beobachtet werden. Die Autoren vermuten daher ebenfalls Anästhesienebenwirkungen als Ursache der Katarakt (4), welche vermutlich nicht von der Wahl des Anästhetikums beeinflusst sind. Auch Viera et al (64) und Bermudez et al (8) diskutieren Nebenwirkungen der Allgemeinanästhesie als Grund der Katarakt, welche nicht nur infolge der von ihnen durchgeföhrten Chloralhydratanästhesie, sondern infolge verschiedener Substanzen beschrieben wurden (1, 7, 67, 69).

Aufgrund welcher Mechanismen Pentobarbital (65), Isofluran (66) und eine Tiletamin-Zolazepam-Xylazin-Kombination (67) eine Katarakt auslösen könnten, wird in den jeweiligen Studien nicht diskutiert.

Ob schlussendlich wirkstoffspezifische Mechanismen einzelner Anästhetika oder Nebenwirkungen der Allgemeinanästhesie die primäre Ursache der Katarakt darstellen, konnte noch nicht endgültig geklärt werden.

Die folgenden Nebenwirkungen werden im Zusammenhang mit der Kataraktformation beschrieben: Ein reduzierter oder fehlender Lidschluss (4, 7), eine Reduktion oder Ausfall des Blinkreflexes (3-5, 7, 65), Beeinflussung der Tränenproduktion (2, 3), Unterbrechung des Tränenfilms auf der Corneaoberfläche (4), Proptosis (=Hervortreten des Augapfels) (2, 5) und eine sekundäre Austrocknung der Corneaoberfläche (1-3, 5, 7, 65, 67), sowie eine Auskühlung der Körpertemperatur der Tiere (8, 64).

### **Osmolaritätstheorie:**

Fraunfelder et al (7) stellten die Theorie auf, dass infolge einer Evaporation eine Austrocknung der Corneaoberfläche, sowie eine transcorneale Beeinflussung der Osmolarität des Kammerwassers und folglich der Osmolarität und des Flüssigkeitshaushaltes oberflächlicher Linsenzellen und /-fasern entsteht, was sich schlussendlich in der Formation einer Katarakt äussert. Viele Wissenschaftler wie Calerone et al (2), Ridder et al (1), Lee et al (67), Gu et al (9) und Tkatchenko et al (3) nehmen Bezug auf diese sogenannte Osmolaritätstheorie von Fraunfelder et al (7), diskutieren die zugrundeliegenden Prozesse und unterstützen diese Theorie. Des Weiteren wird eine Beeinflussung der Kammerwasserproduktion (7) als mögliche Ursache für die Erhöhung der Kammerwasserosmolarität infolge der Anästhesie vermutet.

Zum Nachweis der Osmolaritätstheorie von Fraunfelder et al (7) können die Studien von Weinstock et al (70) und Gu et al (9) herangezogen werden. Anhand von *in vitro* Versuchen an Mäuselinsen konnten Weinstock et al (70) einen Zusammenhang der Kataraktentwicklung mit der Veränderung der Osmolarität einer die Linse umgebenden Flüssigkeit - sprich indirekt der Augenkammerwasserzusammensetzung (Tonizität/Osmolarität/PH) – zeigen. Im Zuge einer Erhöhung des Natriumchloridgehaltes der umgebenden Flüssigkeit kam es zur Ausbildung einer Linsentrübung, umso schneller je höher die Natriumchlorid-Konzentration angesetzt wurde (70). Die Autoren vermuten, dass die Hypertonie der Flüssigkeit, welche *in vivo* dem Augenkammerwasser entspricht, einen vermehrten Wasserausstrom aus subkapsulären Linsenbereichen

bedingt. Diese wiederum könnte sich schliesslich in Form einer Katarakt äussern (70). Ob die Erkenntnisse dieser Studie auf die Linsen lebender Mäuse übertragbar sind, kann allerdings nicht mit Sicherheit gesagt werden. Gu et al (9) konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang der Osmolarität einer substituierten Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche mit der Kataraktformation nachweisen, was für eine transcorneale Beeinflussung im Sinne der Osmolaritätstheorie spricht. Unklar bleibt, inwiefern und wie die Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche die Zusammensetzung des Kammerwassers konkret beeinflusst.

Bermudez et al (8) führten in ihrer Studie bei keiner der Versuchsgruppe Massnahmen zum Schutz vor einer Corneaoberflächenaustrocknung durch und konnten dennoch Unterschiede der Kataraktformation zwischen den in unterschiedlichen Umgebungstemperaturen gehaltenen Gruppen feststellen. Aufgrund dessen schlossen sie den Einfluss einer Corneadehydratation aus und ziehen stattdessen die temperaturbedingte Pathogenese der kalten Katarakt in Betracht.

### **Kalte Katarakt:**

Vor allem kleine Säugetiere wie Mäuse entwickeln während der Allgemeinanästhesie aufgrund der im Verhältnis zur Körpermasse relativ grossen Körperoberfläche einen Abfall der Körpertemperatur (62, 71). Zudem kommt es zum Abfall der Temperatur an der Augenoberfläche (72). Aufgrund dessen kann auch eine Reduktion der Linsentemperatur während der Anästhesie vermutet werden.

Li et al (68) und Li et al (73) zeigten in ihren *in vitro* Studien an Mäuselinsen, dass diese in einer 25 Grad Celsius, sowie in einer 4 Grad Celsius temperierten Lösung eine Katarakt entwickelten, wobei letztere schwerwiegender Grade annahm. Aufgrund des Zusammenhangs mit der Absenkung der Linsentemperatur, spricht man auch von einer sogenannten kalten Katarakt (74). Die Autoren konnten eine Assoziation der erhöhten Lichtstreuung der Katarakt mit einer ungleichmässigen Verteilung der Linsenproteine und Wasser innerhalb der Linsenfasern herstellen (68). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das Absenken der Temperatur zu einer Akkumulation und Aggregation von Proteinen führen könnte, was die These einer Kataraktformation infolge einer supermolekularen Organisation von Proteinkomplexen (73) unterstützt. Als essentielle Komponenten solcher Komplexe

werden die Proteine Phakinin und Filensin - als Bestandteile der linsenspezifischen perlörmigen Intermediärfilamente (75) – aufgeführt (73). Aufgrund einer bestehenden, wenn auch reduzierten, Kataraktformation von 129WT Mäusen – in welchen immunhistologisch sehr geringe Filensin und Phakinin-Level nachgewiesen wurden (73) - sowie Filensin-knockout-Black6-Mäusen, wird eine Beteiligung weiterer Komponenten und Proteinkomplexe vermutet (73). Die Beteiligung einer Gamma-Kristallin-Aggregation wie sie bei Spezies wie Ratten und Kälbern diskutiert wird (74, 76-78) wäre denkbar und könnte bei Mäusen aufgrund einer Reduktion der kalten Katarakt infolge einer Gamma-Kristallin-Mutation (79) angenommen werden.

Im Zusammenhang mit der Proteinaggregation wird infolge der Umverteilung der aggregierten Proteinkomplexe innerhalb der Linsenfasern von einer Phasenseparation der ursprünglichen Protein-Wasser-Mischung gesprochen (74).

*In vivo* untersuchten Bermudez et al (8) die Entwicklung einer Katarakt bei Mäusen, welche unterschiedlichen Umgebungstemperaturen zwischen 0 und 37Grad Celsius ausgesetzt wurden. Die Autoren konnten eine Kataraktformation nach Absenken der Umgebungstemperatur beobachten und betrachteten dies als Hinweis für die Pathogenesetheorie der kalten Katarakt. Bermudez et al (8) konnten keinen exakten, kritischen Schwellenwert der Temperatur bestimmen, unterhalb dessen sich die Katarakt entwickelt. Da sie diese allerdings in den Versuchsgruppen unter 25 Grad Celsius beobachten konnten, geben sie diesen Wert als bedeutsam an. Ridder et al (1) vermuten, dass bereits ein Körpertemperaturabfall von 2-4 Grad eine Katarakt bei Mäusen auslösen kann. Diese Aussage beruht jedoch auf laborinternen Beobachtungen anstatt auf publizierten, statistisch signifikanten Studienergebnissen. In der Literatur lassen sich weiterhin Hinweise finden, dass das Alter der Tiere für den Temperaturschwellwert und die Entstehung der kalten Katarakt eine Rolle spielt (76, 80).

Ridder et al (1) und Viera et al (64) führen auf, dass eine temperaturbedingte Katarakt aufgrund des systemischen Einflusses in beiden Augen im selben Ausmass zu beobachten sein müsste. Da sie jedoch Unterschiede der Kataraktformation in beiden Augen eines Tieres beobachteten, stellen die Autoren eine primär temperaturbedingte Pathogenese der Katarakt in Frage. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass *in vivo* bezüglich der kalten Katarakt anästhesierter Mäuse weiterer Klärungsbedarf besteht.

Zusammenfassend wird die Pathogenese der Katarakt anästhesierter Mäuse in der Literatur kontrovers diskutiert und keine der Theorien kann als endgültig erwiesen erachtet werden.

#### **2.3.4. Verlauf**

Bisherige Studien beschreiben das erstmalige Auftreten der Katarakt circa 10-20 Minuten nach Verabreichung der Anästhetika (1-5, 7, 8, 63, 64, 66).

Der Verlauf der Kataraktformation wird basierend auf Spaltlampenuntersuchungen wie folgt beschrieben: Zunächst ist eine anteriore Trübung der zentralen, Y-förmigen Linsennahtlinien, insbesonders derer Endpunkte, zu beobachten. Davon ausgehend breitet sich die Trübung im anterioren Lisenkortex weiter in Richtung der peripheren bzw. equatorialen Zone aus. Im finalen Stadium zeigt die gesamte Linse bei frontaler Betrachtung eine diffuse, milchig-weiße Trübung (2, 7-9, 64, 67). Des Weiteren nimmt die Intensität der Trübung mit Fortschreiten der Entwicklung zu (8, 9).

Infolge der Aufnahme von OCT-Scans beschreiben Gu et al (9) die Katarakt anästhesierter Mäuse als stark hyperreflektives Signal der anterioren Linse. Gemäß Bell et al (65) entwickelt sich die Katarakt als linear ansteigende Veränderung des Linsengewebes, welche sie graphisch auf B-Scans markieren. Jedoch gehen die Autoren nicht näher auf die topographische Position der Katarakt ein. Eugui et al (53) beschreiben die Position der Katarakt und deren Verlauf als zunächst schmale Lichtstreuung, welche zu einer schwerwiegenden Kortexveränderung mit gesteigerter Intensität der Lichtstreuung fortschreitet. Zudem konnte das Auftreten hyporeflektiver Läsionen im anterioren Lisenkortex beobachtet werden (53). Allerdings sollte beachtet werden, dass die Abbildungen dieser Publikationen (53, 65) nur einen anterioren Abschnitt der Linse beinhalten.

Abweichend von diesen Beobachtungen stellten Li et al (68) *in vitro* beim Absenken der Linsentemperatur auf 25 Grad Celsius zunächst eine kernnahe Trübung, bei Erreichen tieferer Temperaturen von 4 Grad Celsius zudem eine Trübung weiter kortikal befindlicher Bereiche fest.

#### **2.3.5. Reversibilität**

In bisherigen Studien wurde stets eine Reversibilität der während der Allgemeinanästhesie auftretenden Katarakt bei Mäusen beschrieben (1-5, 7-9, 63, 64, 67, 81).

Die Dauer bis zur vollständigen Rückentwicklung der Katarakt wird *in vivo* in einem Zeitraum von circa 60 Minuten (2, 64) bis zu mehreren Stunden (3, 4, 8, 81) nach Verabreichung der Anästhetika angegeben. Li et al (68) beschreiben *in vitro* einen Rückgang der beobachteten kalten Katarakt nach dem erneuten Erwärmen der Linsen innerhalb von 2 Minuten.

Die Rückentwicklung der Katarakt wird vom anterioren Linsenpol ausgehend in Richtung des peripheren Linsenkortex und equatorialer Bereiche der Linse beschrieben (2, 7). Die Richtung ist demzufolge identisch zur Entwicklungsrichtung. Allerdings konnten Fraunfelder et al (7) gelegentlich zuerst ein zufälliges aufklaren exzentrischer Bereiche beobachten.

Die selbstständige und vollständige Wiederherstellung der Linsetransparenz stellt eine besonders hervorzuhebende Eigenschaft der anästhesiebedingten Katarakt dar. Der Literatur können vereinzelte Fallberichte einer transienten Katarakt infolge einer Vitrektomie (82) oder im Zusammenhang mit einer diabetischen Erkrankung (83-85) beim Menschen entnommen werden. Diese sind jedoch eine Seltenheit. Allgemein gilt die Katarakt Erfahrungswerten zufolge als chronischer und irreversibler Prozess, zu dessen Therapie ein operativer Austausch der Linse benötigt wird (86, 87).

### **2.3.6. Beeinflussende Faktoren**

Untersuchungen potentiell beeinflussender Faktoren auf die Katarakt anästhesierter Mäuse erfolgten anhand einer Beeinflussung der Austrocknung der Corneaoberfläche (1, 4, 7, 9, 64, 66, 67, 88), einer Beeinflussung der Temperatur (8), der Anwendung einer topikalen Applikation von Mydriatika (81) und einer unterschiedlichen Auswahl und Dosierung der Anästhetika (1, 4, 67).

#### **Beeinflussung der Austrocknung der Corneaoberfläche:**

Infolge einer wiederholten, topikalen Applikation feuchthalter Substanzen auf die Corneaoberfläche konnten Ridder et al (1), Li et al (4), Lee et al (67) und Claoué et al (81) eine Reduktion der Kataraktformation beobachten. Demgegenüber konnten Viera et al (64) keinen protektiven Effekt nach einer einmaligen, unilateralen Applikation einer befeuchtenden Substanz feststellen.

Gu et al (9) zeigten anhand ihrer Untersuchungen die Bedeutung der Osmolarität von topikal auf die Corneaoberfläche substituierten Flüssigkeiten für die Kataraktformation: Das Aufbringen hypotoner Lösungen (=100mOsmol/kg)

konnte die Kataraktformation reduzieren, während hypertone Lösungen (>500mOsmol/kg) diese förderten (9).

Des Weiteren konnte mit Hilfe des Einsatzes von Kontaktlinsen auf der Corneaoberfläche (1, 7, 66) oder einem mechanischen Lidschluss (1, 7, 88) eine Kataraktformation reduziert, teilweise sogar gänzlich vermieden werden.

### **Beeinflussung der Umgebungstemperatur:**

Bermudez et al (8) konnten eine Steigerung der Inzidenz, Intensität und Entwicklungsgeschwindigkeit der Katarakt mit fortschreitender Abnahme der Umgebungstemperatur beobachten.

### **Mydriatika:**

Eine vollständige, detaillierte ophthalmologische Untersuchung der Linse und posteriorer Augenabschnitte benötigt eine topikale Applikation von Mydriatika (35). Für die Untersuchung der Katarakt anästhesierter Mäuse wurden eine Kombination aus Phenylephrin und Tropicamid (1, 4, 9, 47, 65-67) oder eine alleinige Tropicamid- (3, 5, 8, 53, 64) beziehungsweise Phenylephrinapplikation (81) verwendet.

Eine alleinige Applikation von Tropicamid (64), sowie Tropicamid-Phenylephrin (4) führte ohne Verabreichung von Anästhetika nicht zur Detektion einer Katarakt. Dies lies die Autoren im Umkehrschluss vermuteten, dass auch während der Anästhesie kein Einfluss der Mydriatika auf die Kataraktformation besteht. Da jedoch keine vergleichenden Untersuchungen während der Anästhesie erfolgten, könnte diese Schlussfolgerung durchaus angezweifelt werden. Solche Bedenken könnten von der Studie von Claoué et al (81) bestätigt werden, welche bei anästhesierten Mäusen nach Einsatz von Phenylephrin gegenüber der Kontrollgruppe ohne Phenylephrinapplikation eine gesteigerte Kataraktformation nachwiesen. Da letztere infolge einer zusätzlichen Befeuchtung der Corneaoberfläche nach Applikation des Phenylephrins jedoch keine Katarakt beobachteten (81), muss hinterfragt werden, inwiefern das Phenylephrin per se oder die fehlende Corneabefeuchtung die Katarakt im ersten Versuch der Studie von Claoué et al (81) auslöste.

Die Möglichkeit eines Einflusses der Mydriatika auf die Kataraktformation kann infolge dieser Studien somit nicht eindeutig geklärt werden.

**Wahl und Dosierung der Anästhetika:**

Der vergleichende Einsatz verschiedener Anästhesieprotokolle lies weder Ridder et al (1), noch Li et al (4) signifikante Unterschiede der Kataraktentwicklung feststellen. Hervorzuheben ist, dass Li et al (4) dies sogar trotz gänzlich unterschiedlicher Applikationswege in Form einer Injektions- und einer Inhalationsanästhesie zeigen konnten.

Signifikante Unterschiede der Kataraktentwicklung in Folge unterschiedlicher Dosierungen einer Xylazin-Ketamin- (1), Avertin- (1) oder Tiletamin/Zolazepam/Xylazin- (67) Anästhesie konnten in den entsprechenden Studien nicht festgestellt werden. Ein Vergleich der Studien von Ridder et al (1) und Calderone et al (2) hingegen, lässt durchaus Unterschiede in der Kataraktformation aufgrund verschiedener Dosierungen des Ketamins vermuten. Gemäss Ridder et al (1) lassen sie diese Unterschiede auf das Erreichen unterschiedlicher Anästhesiestadien zurückführen. Somit könnte geschlussfolgert werden, dass nicht die umittelbare Dosis, sondern vielmehr die dosisabhängige Anästhesietiefe einen entscheidenden Einfluss auf die Formation der Katarakt hat.

**Mausstamm**

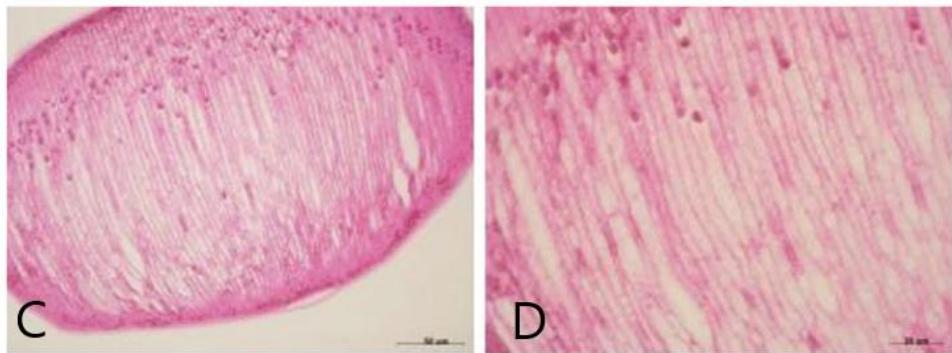
Untersuchungen von Claoué et al (81) zeigen nach topikaler Applikation von 10%iger Phenylephrinlösung eine mildere Kataraktformation und kürzere Dauer der Katarakt in BALB/c Mäusen verglichen mit C57BL/6 und CBA Mäusen.

**Geschlecht**

Das Geschlecht der Mäuse spielt für die Formation der Katarakt gemäss einer *in vitro* Untersuchung von Li et al (73) keine Rolle.

**2.3.7. Histologie**

Im Zusammenhang mit einer Katarakt anästhesierter Mäuse wurden im Rahmen der Studie von Li et al (4) eine unordentliche Verteilung und ungleichmässige Dicke der Linsenfasern nach Auswertung Hämytoxylin-Eosin-gefärbter, histologischer Schnitte beschrieben(Abbildung 10). Fraunfelder et al (7) hingegen berichten, dass keine histologischen Veränderungen infolge der Katarakt feststellbar waren. Letztere führten neben einer Hämytoxylin-Eosin- auch eine Periodsäure-Schiff- und eine Trichrom-Färbung zur Untersuchung durch (7).



**Abbildung 10: C und D: Linsenfaserveränderung und Kataraktentwicklung nach Tropicamid und Phenylephrin-Applikation plus Sevofluran-Inhalationsnarkose ohne Carbomeraugentropfen. Abbildung entnommen aus (4) und beschriftet via Paint 3D (17) von Jenny Klausmann**

### 2.3.8. Weitere Spezies mit Kataraktformation unter Allgemeinanästhesie

Eine während der Allgemeinanästhesie auftretende Katarakt konnte nicht nur bei Mäusen, sondern auch bei weiteren Nagetierspezies wie Ratten (2, 7, 63) und Hamstern (7) beobachtet werden. Basierend auf Erfahrungsberichten aus dem Praxisalltag und Angaben aus der Literatur (63) könnte vermutet werden, dass Mäuse vergleichsweise häufiger eine solche Katarakt entwickeln. Ob es sich bei allen Spezies um dieselbe Kataraktform mit identischen zugrundeliegenden Pathomechanismen handelt, lässt sich anhand der bisherigen Literatur nicht mit Sicherheit feststellen.

Fraunfelder et al (7) erwähnen das Auftreten einer anterior-kortikalen, reversiblen Katarakt zudem in Meerschweinchen, Kaninchen und Katzen. Da diese Spezies in dieser Studie jedoch nicht zum Einsatz kamen und nicht erläutert wird, auf welchen Untersuchungen diese Aussage basiert, bleibt unklar ob diese Hypothese tatsächlich bewiesen und unter welchen Bedingungen die Katarakt in diesen Spezies beobachtet werden konnte.

### 2.3.9. Limitationen bisheriger Literatur

Die aktuelle Literatur lässt Limitationen in Bezug auf das Studiendesign, die Datenerfassung und die Interpretation der Ergebnisse erkennen:

Bisherige Studien fokussieren sich primär auf die Beurteilung der Kataraktformation (1, 8, 64). Ein Zusammenhang der Katarakt mit der Veränderung weiterer Parameter wie der Körpertemperatur (1, 64) und der Augenkammertiefe (7) wird zwar vermutet, jedoch wurden keine protokollierten Daten oder diesbezüglich eingesetzte Untersuchungsmethoden angegeben. Inwiefern die

Katarakt unmittelbar mit der Veränderung dieser Parameter zusammenhängt bleibt daher offen. Des Weiteren beschränkten sich bisherige Studien bezüglich der beeinflussenden Faktoren der Katarakt auf einzelne Versuchsbedingungen wie die verabreichten Anästhetika (1, 4), die Umgebungstemperatur (8), Mydratika (81) oder die Befeuchtung der Corneaoberfläche (1, 4, 9), was keinen Vergleich der Einflüsse all dieser Faktoren zulässt. Zudem sollte betont werden, dass die teilweise angewandten Injektions-Anästhetika Avertin (1), Chloralhydrat (4, 8, 9, 64) und Pentobarbital (65) gemäss dem Statement der GV-Solas (89) (= Gesellschaft für Versuchstierkunde) nicht mehr dem heutigen Standard entsprechen. Bei Verwendung heutzutage empfohlener Anästhetika könnte die Übertragbarkeit der auf diesen Studien basierenden Erkenntnisse daher in Frage gestellt werden.

Die Datenerfassung erfolgte in bisherigen Studien zur Katarakt anästhesierter Mäuse anhand einer semiquantitativen Beurteilung (1, 4, 64, 67). Quantitative Ausmessungen der Kataraktdimensionen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden unserem Kenntnisstand zufolge nicht durchgeführt.

Verschiedene Autoren beziehen in die Diskussion und Interpretation ihrer Ergebnisse Erkenntnisse weiterer Studien unter Verwendung von Ratten (2, 65, 81) und Hamstern (1, 4, 9, 81) mitein und lassen dabei die Möglichkeit speziesbedingter Unterschiede aussenvor. Fraunfelder et al (7) beschreiben die Katarakt sogar speziesübergreifend für Mäuse, Hamster und Ratten. Da speziesbedingte Unterschiede und Einflüsse jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, stellt diese fehlende Separation verschiedener Spezies eine bedeutsame Minderung der Aussagekraft der Interpretation der entsprechenden Studien dar.

#### **2.4. Zielsetzung, Fragestellung und Hypothesen**

Ziel dieser Arbeit ist es, unter heutzutage praktisch üblichen Versuchsbedingungen potentielle Einflüsse der folgenden Faktoren auf die Kataraktinzidenz und -formation anästhesierter Mäuse vergleichend zu untersuchen:

- a) Die Anwendung verschiedener Applikationsmethoden und Substanzen zur Corneabefeuchtung
- b) Der Einsatz verschiedener Mydriatika
- c) Der Einsatz verschiedener, heutzutage empfohlener Anästhesieprotokolle

- d) Der Einsatz verschiedener Mausstämme
- e) Den Einsatz einer einseitigen oder allseitigen externen Wärmezufuhr
- f) Das Geschlecht der Mäuse

Neben einer semiquantitativen und quantitativen Untersuchung der Kataraktformation sollen weitere Parameter - der Flüssigkeitsgehalt auf der Corneaoberfläche, die Corneadicke, Tiefe der Augenkammer, die Pupillenweite, der Linsendurchmesser und die Körpertemperatur - überwacht und im Zusammenhang mit der Katarakt ausgewertet werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 84 C57BL/6J Mäuse und 14 BALB/c Mäuse verwendet. Alle Tiere stammten von Charles River Laboratories (Sandhoferweg 7, D-97633 Sulzfeld). Sie waren zum Versuchsszeitpunkt circa 8 Wochen alt. Männliche und weibliche Tiere sind mit einer Verteilung von 50:50 ausgewählt worden.

Zur Identifikation der Tiere wurden Käfigkarten und farbige Schwanzmarkierungen genutzt.

#### Akklimatisierungsphase: Haltung und Fütterung

Am Ankunftstag der Tiere wurde deren Allgemeinbefinden anhand des Verhaltens, der Körperhaltung, des Bewegungsablaufes und des Pflegezustandes kontrolliert, das Körpergewicht gemessen und eine Untersuchung der Augen mittels Spaltlampe durchgeführt. Aufgrund von Abwehrbewegungen der wachen Tiere war lediglich eine kurze Spaltlampenuntersuchung des anterioren Segmentes möglich, um mögliche pathologische Veränderungen zu erkennen. Während der 2-wöchigen Akklamatisierungsphase wurde das Allgemeinbefinden täglich überprüft und das Gewicht alle 7 Tage protokolliert. Nur Tiere ohne Vorerkrankungen wurden in der Studie verwendet.

Die Tiere wurden in durchsichtigen Polycarbonat Individual-Ventilated-Cages (=IVC) (Sealsafe Plus GM500, Tecniplast Suisse AG, Gams, Schweiz) mit einer Grösse von 391x199x160 mm und einer Bodenfläche von 500cm<sup>2</sup> gehalten. Während weibliche Tiere in Gruppen von 2-3 Tieren zusammengehalten wurden, wurden die männlichen Tiere aufgrund des Risikos von Verletzungen durch Rangkämpfe einzeln gehalten. Es wurde ein 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus eingehalten. Die Lufttemperatur betrug 22+- 2°C und es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 55 +/- 5%. Als Einstreu wurden staubfreie Weichholzpellets (J. Rettenmaier & Söhne Schweiz AG, Horn, Schweiz) verwendet. Den Tieren stand eine pelletierte Alleindiät (Granovit AG, Kaiseraugst, Schweiz), sowie Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Jeder Käfig enthielt wöchentlich variierendes Enrichement in Form von Nestmaterial (Pura Crinkle, LABODIA

Schweiz, Niederglatt, Schweiz), einem roten Plastikhäuschen/einer Plastikröhre (Techniplast Suisse AG, Gams, Schweiz), sowie Beschäftigungsmaterial in Form von Nagehölzern (LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich) oder Hanfseilen (Cordag AG, Aesch, Schweiz).

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Gruppeneinteilung

Der Versuch wurde in 2 Teilen durchgeführt. Das linke Auge wird im folgenden mit „OS“ (= *Oculus sinister*), das rechte mit „OD“ (= *Oculus dexter*), beide Augen mit „OU“ (= *Oculus uterque*) abgekürzt.

##### Versuchsteil 1:

Im ersten Versuchsteil wurde der Einfluss verschiedener Cornea-Befeuchtungs-Protokolle auf die Katarakt untersucht:

Gemäss Tabelle 1 wurden die 42 Mäuse in die Gruppen 1 (n=24 Mäuse) und 2 (n=18 Mäuse) aufgeteilt, um den Einfluss verschiedener Applikationsmethoden corneabefeuchtender Substanzen zu untersuchen. Für einen tierinternen Vergleich des Einflusses verschiedener Substanzen zur Corneabefeuchtung wurde Gruppe 2 weiterhin in die Subgruppen 2a und 2b (jeweils n=9 Mäuse) unterteilt (siehe Tabelle 2). Details zu den jeweiligen Befeuchtungs-Protokollen können Kapitel 3.2.3.1 entnommen werden.

Eine Gruppe mit einer Kataraktinzidenz über 0% und unter 100% sollte im ersten Versuchsteil bestimmt und deren Befeuchtungs-Protokoll im zweiten Versuchsteil bei allen Gruppen eingesetzt werden.

Gruppe	Auge	Variierend: Applikationsmethode zur Corneabefeuchtung	Tier- zahl	Augen- zahl
1	OU	Protokoll 1	24	48
2	OD	Protokoll 2	18	18

**Tabelle 1: Übersicht Versuchsteil 1, Gruppen 1 + 2 (Vergleich der Applikationsmethode des Befeuchtungsprotokolls)**

**Tabelle 2: Übersicht Versuchsteil 1, Gruppen 2a + 2b (Vergleich verschiedener**

Gruppe	Auge	Variierend: Substanzen der Corneabefeuchtung	Tierzahl	Augenzahl
2a	OD	Protokoll 2	9	9
	OS	Protokoll 3	9	9
2b	OD	Protokoll 2	9	9
	OS	Protokoll 4	9	9

### **Substanzen zur Corneabefeuchtung)**

#### Versuchsteil 2:

Im zweiten Versuchsteil wurden in den Gruppen 3-6 (jeweils n= 14 Mäuse) positive und negative Einflüsse auf die Katarakt durch Variation weiterer Faktoren - die topikale Mydriatikaapplikation, das Anästhesieprotokoll, der Mausstamm oder die externe Wärmezufuhr - untersucht (Zuordnung siehe Tabelle 3). Die Gruppe mit dem gewählten Befeuchtungsprotokoll aus dem ersten Versuchsteil (= Gruppe 2 OD), wurde im zweiten Versuchsteil als Kontrollgruppe verwendet.

Gruppe	Auge	Variierender Parameter	Tierzah	Augenzahl
2	OD	- (= Kontrollgruppe)	18	18
3	OU	Mydriatika	14	28
4	OU	Anästhesieprotokoll	14	28
5	OU	Mausstamm	14	28
6	OU	Externe Wärmezufuhr	14	28

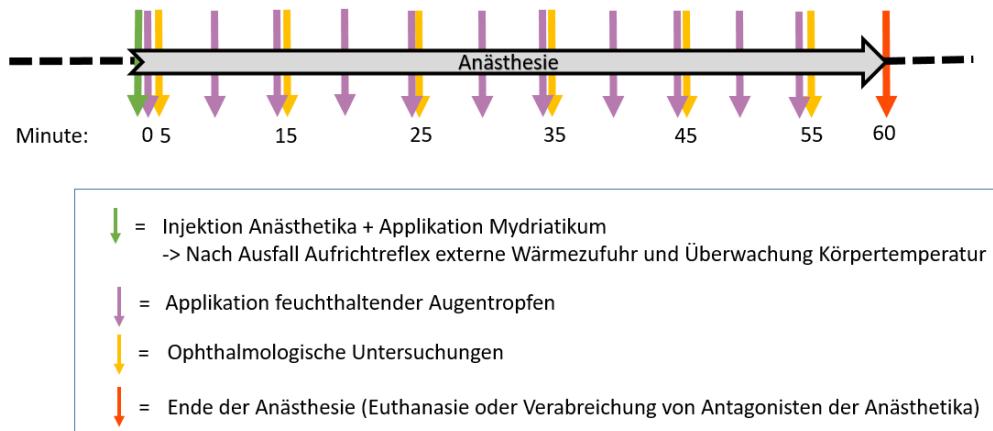
**Tabelle 3: Übersicht Gruppeneinteilung Versuchsteil 2**

#### **3.2.2. Allgemeine Versuchsdurchführung**

Im Folgenden werden allgemeine Rahmenbedingungen und Versuchsmethoden geschildert, welche unabhängig von der jeweiligen Gruppenzuordnung für alle Versuchstiere in gleicher Weise gelten. Abbildung 11 veranschaulicht diese allgemeinen Versuchsabläufe. Im Kapitel 3.2.3 werden anschliessend einzelne, zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen variierende Versuchsbedingungen detailliert erläutert.

Jedes Tier wurde für 55-60 Minuten anästhesiert. Nach intraperitonealer Injektion der Anästhetika und beidseitiger, topikaler Mydriatikumsapplikation, wurden die Mäuse einzeln zurück in einen Käfig gesetzt. Der Ausfall des Aufrichtreflexes nach

verbringen des Tieres in Rückenlage wurde als Indikator für das Erreichen eines angemessenen Anästhesiestadiums und Zeitpunkt t=0 der Anästhesie definiert. Unmittelbar nach Ausfall dieses Reflexes wurde die jeweilige Maus in Brust-Bauch-Lage auf dem Untersuchungstisch positioniert. Gemäss ihrer Gruppenzuordnung erhielten die Tiere anschliessend eine externe Wärmezufuhr (siehe 3.2.3.5). Die Körpertemperatur wurde über den gesamten Anästhesieverlauf kontinuierlich mit Hilfe eines digitalen Thermometers (Thermes USB WIFI, Physitemp Instruments, Clifton, USA) und einer Rektalsonde (RET-3 Rectal Probe for Mice, Physitemp Instruments, Clifton, USA) überwacht und protokolliert. Tasthaare und Wimpern der Tiere wurden mit Augengel (Viskotears, Bausch & Lomb Swiss AG, Zug, Schweiz) angefeuchtet und mit dem Fell weggestrichen, um eine Beeinflussung späterer ophthalmologischer Untersuchungen durch diese zu verhindern. Zum Zeitpunkt t=2 Minuten wurden verbliebene, überschüssige Tropfenreste des vorab applizierten Mydriatiukums auf der Cornea mit Hilfe eines Wattetupfers (Sugi Eyespear, Kettenbach GmbH & Co KG, Eschenburg, Deutschland) entfernt. Je nach Studienprotokoll wurden anschliessend entweder feuchthaltende Augentropfen oder ein weiteres Mydriatikum topikal appliziert (siehe Kapitel 3.2.3.2). Bei Applikation eines weiteren Mydriatiukums wurden verbliebene, überschüssige Tropfenreste nach 3-5 Minuten mittels Wattetupfer (Sugi Eyespear, Kettenbach GmbH & Co KG, Eschenburg, Deutschland) entfernt und anschliessend mit der Applikation feuchthaltender Augentropfen begonnen. Im Verlauf der Anästhesie erfolgten wiederholt Applikationen feuchthaltender Augentropfen und ophthalmologische Untersuchungen. Um die Corneaoberfläche nicht zu beschädigen, wurde darauf geachtet nicht direkt mit dieser in Berührung zu kommen. Gruppenspezifisch wurden die Tiere unmittelbar im Anschluss oder 22-26 Stunden nach der Anästhesie euthanisiert und *ex vivo* Untersuchungen der Linse durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.4).



**Abbildung 11: Schema zum allgemeinen Versuchsablauf**

### 3.2.2.1. Ophthalmologische Untersuchungen

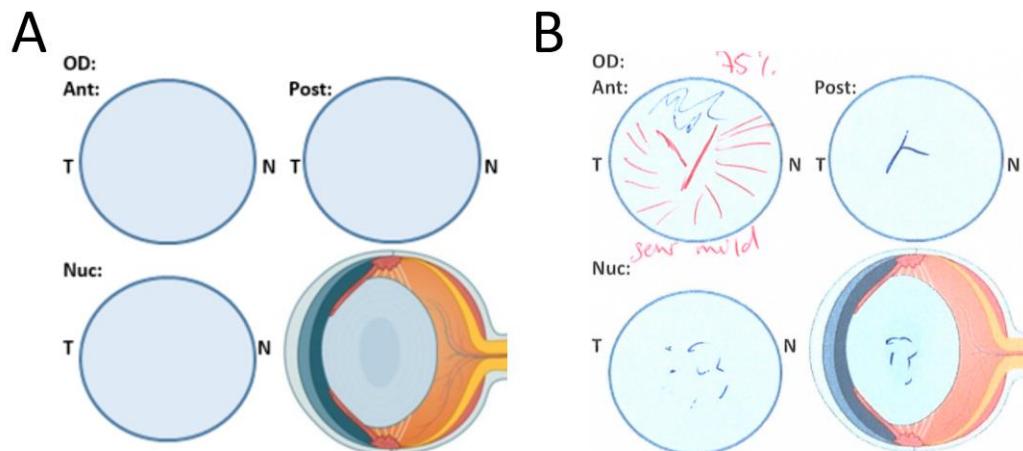
Während der Anästhesie wurden im Abstand von 10 Minuten regelmässig Spaltlampenuntersuchungen durchgeführt und OCT-Aufnahmen angefertigt.

#### Spaltlampenuntersuchung

Für die Spaltlampenuntersuchungen wurde eine portable Handspaltlampe (Kowa SL-17, Firma Kowa Europe GmbH) verwendet.

Der Lichtstrahl wurde im 37 Grad Winkel zur Mikroskopachse eingestellt. Aufgrund der geringen Grösse des Mausauges erfolgte die Untersuchung mithilfe der 16fachen Vergrösserung und der kürzesten Spaltlänge (Spotbeleuchtungsgrösse 5). Eine Spaltbreite von 0,2mm und maximale Helligkeitsstufe (Stufe 5) wurde gewählt. Für den Zeitraum der jeweiligen Spaltlampenuntersuchung wurde der Versuchsräum abgedunkelt.

Beurteilt wurden die Linse, inklusive der anterioren/posterioren Linsenkapsel, den Linsennähten, dem Kortex und Nukleus, sowie die Augenlider, die Konjunktiven, die Cornea, die vordere Augenkammer, Iris und anteriore Glaskörperabschnitte. Sämtliche nicht-physiologischen Abweichungen und Befunde wurden in einem Excel-Bewertungsbogen dokumentiert. Die Befunde der Linse wurden skizziert (Abbildung 12) und die zweidimensionale Ausdehnung der Katarakt bei frontaler Betrachtung (=abgekürzt «AKfB») prozentual abgeschätzt. Mithilfe einer Spiegelreflexkamera wurden einzelne Befunde beispielhaft protokolliert.



**Abbildung 12:** a) Schema zur Dokumentation klinischer Spaltlampenbefunde; OD= rechtes Auge; Ant =anteriorer, Nuc =nukleärer und Post=posteriorer Querschnitt der Linse, und Längsquerschnitt; T=temporal, N=nasal b) Beispiel mit anteriorer Katarakt, nukleären hyperreflektiven Spots und posteriorer Linsennahtlinie

### Optische Kohärenztomografie

Für das Generieren der OCT-Scans wurde das SS-OCT CASIA2 (Tomey Corporation Japan, Nagoya, Japan) verwendet.

6 Aufnahmen wurden pro Tier im Verlauf der Anästhesie angefertigt. Das erstellte Aufnahmeprotokoll beinhaltete pro Messzeitpunkt 256 horizontale B-Scans mit einer Auflösung von 2000 Pixeln über ein Raster von 4mm Weite x 3mm Länge x 11mm Tiefe. Die Scanzeit umfasste 10,75 Sekunden pro Messzeitpunkt. Über den gescannten Bereich hinaus wurde zudem eine frontale Fotografie des Auges angefertigt (= En-Face-Aufnahme).

#### **3.2.3. Variation verschiedener Versuchsbedingungen**

In den folgenden Unterkapiteln werden die während der Allgemeinanästhesie zwischen den Gruppen variierenden Parameter detailliert erläutert. Eine zusammenfassende Übersicht über die Versuchsbedingungen der einzelnen Gruppen ist anschliessend in Tabelle 12 (Kapitel 3.2.3.6) dargestellt.

##### **3.2.3.1. Corneabefeuchtung**

Verschiedene Befeuchtungsprotokolle (Tabelle 4-7) wurden zum Vergleich des Einflusses verschiedener, zur Corneabefeuchtung eingesetzter Applikationsmethoden und Substanzen verwendet: Gruppe 1 erhielt Protokoll 1, die rechten Augen der Gruppe 2 Protokoll 2, die linken Augen der Gruppe 2a Protokoll 3 und die linken Augen der Gruppe 2b Protokoll 4 (siehe Tabelle 1+2).

Nach Auswertung der Ergebnisse des ersten Versuchsteils kam Protokoll 2 im zweiten Versuchsteil auch in den Gruppen 3-6 zum Einsatz.

Die Protokolle 1 und 2 beinhalteten die einmalige Applikation einer hochviskosen Hypromelloselösung (Methocel 2%, OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland), gefolgt von einer wiederholten Applikation physiologischer, 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) gemäss Tabelle 4 und 5. Hervorzuhebende Unterschiede zwischen den beiden Protokollen sind der Einsatz einer Einweg-Feindosierungsspritze (Soft-Ject F, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) in Protokoll 1 und einer Pipette (Eppendorf Research Plus Pipette, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) in Protokoll 2 zur Applikation der Natriumchloridlösung. Bei Protokoll 1 wurden jeweils circa 50 µl Natriumchloridlösung, bei Protokoll 2 exakt 5 µl Natriumchloridlösung appliziert. Protokoll 3 (Tabelle 6) beinhaltete die wiederholte Applikation von Natriumhyaluronat-Augengel (Lacrycon, Novartis, Basel, Schweiz) und Protokoll 4 (Tabelle 7) von 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland). Unterschiede sind neben den verwendeten Substanzen bezüglich der Applikationsfrequenz zu finden: Im Rahmen von Protokoll 3 erfolgte die Applikation alle 3 Minuten, in Protokoll 2 und 4 alle 5 Minuten.

Gruppe 1 (OU)	Protokoll 1	
	Hypromelloselösung	Natriumchloridlösung
Wirkstoff (Konzentration):	Hypromellose (20mg/ml)	Natrium-Chlorid (0.9g/100ml)
Weitere Inhaltstoffe:	Benzalkoniumchlorid (0,1mg/g), Borsäure, Trometamol, Wasser	Wasser
Applikationsmethode:	Topikal auf die Cornea direkt aus der Ampulle	Topikal auf die Cornea per 1ml-Einweg- Feindosierungsspritze
Verabreichungs- zeitpunkt:	Einmalig bei t=2min	Ab t= 7min alle 5 Minuten
Volumen:	circa 50µl	circa 50µl

**Tabelle 4: Corneabefeuchtung Protokoll 1**

Gruppe 2 (OD) und Gruppen 3-6 (OU)	Protokoll 2	
	Hypromelloselösung	Natriumchloridlösung
Wirkstoff (Konzentration):	Hypromellose (20mg/ml)	Natrium-Chlorid (0.9g/100ml)
Weitere Inhaltstoffe:	Benzalkoniumchlorid (0,1mg/g), Borsäure, Trometamol, Wasser	Wasser
Applikationsmethode:	Topikal auf die Cornea direkt aus der Ampulle	Topikal auf die Cornea per Pipette
Verabreichungszeitpunkt:	Einmalig bei t=2min (bzw 7min in Gruppe 3)	Ab t= 7min (bzw 12min in Gruppe 3) alle 5 Minuten
Volumen:	Circa 50µl	5 µl

**Tabelle 5: Corneabefeuchtung Protokoll 2**

Gruppe 2a (OS)	Protokoll 3
	Natriumhyaluronat-Augengel
Wirkstoff (Konzentration):	Hyaluronsäure (0.14mg/ml), Natriumhyaluronat (0,15mg/ml)
Weitere Inhaltsstoffe	Polyacrylsäure (0,12mg/ml), Glycerin (25mg/ml), Wasser
Applikationsmethode:	Topikal per Pipette auf die Cornea
Verabreichungszeitpunkt:	Ab t= 2min alle 3 Minuten
Volumen:	5 µl

**Tabelle 6: Corneabefeuchtung Protokoll 3**

Gruppe 2b (OS)	Protokoll 4
	Natriumchloridlösung
Wirkstoff (Konzentration):	Natrium-Chlorid (0.9g/100ml)
Weitere Inhaltstoffe:	Wasser
Applikationsmethode:	Topikal per Pipette auf die Cornea
Verabreichungszeitpunkt:	Ab t= 2min alle 5min
Volumen:	5 µl

**Tabelle 7: Corneabefeuchtung Protokoll 4****3.2.3.2. Mydriatika**

Die topikale Applikation des Mydriatikums Tropicamid (Tropicamide 0,5% SDU Faure, Thea PHARMA S.A., Schaffhausen, Schweiz) erfolgte gemäss Tabelle 8. Die Tiere der Gruppe 3 erhielten anstelle der ersten Applikation feuchthaltender Augentropfen zusätzlich das Mydriatikum Atropin (Atropine 0,5% SDU Faure, Thea PHARMA S.A., Schaffhausen, Schweiz) gemäss Tabelle 9.

Substanz:	Tropicamide 0,5% SDU Faure
Inhaltsstoff:	Tropicamid
Verabreichung:	Einmal unmittelbar nach Verabreichung der Anästhetika topikal auf die Cornea
Volumen:	1 Tropfen pro Auge (ca 50 µl)

**Tabelle 8: Mydriatikum Tropicamid**

Substanz:	Atropine 0,5% SDU Faure
Inhaltsstoff:	Atropin
Verabreichung:	Circa 2min nach Ausfall des Aufrichtreflexes (=unmittelbar nach Abnahme des Tropicamidtropfens) topikal auf die Cornea
Volumen:	1 Tropfen pro Auge (ca 50 µl)

**Tabelle 9: Mydriatikum Atropin (nur in Gruppe 3 zusätzlich hinzugefügt)****3.2.3.3. Anästhesieprotokoll**

Gruppe 1-3, 5 und 6 wurde mit dem Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-Anästhesieprotokoll (im folgenden abgekürzt mit MMF) anästhesiert (Details siehe Tabelle 10). In Gruppe 4 kam ein Xylazin-Ketamin-Protokoll (Tabelle 11) zum Einsatz. Die Injektion erfolgte bei beiden Protokollen intraperitoneal via 1ml Spritze (Soft-Ject F, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) und 25G Kanüle (Sterican Kanüle G25x1½ 0,5x40mm, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland).

Gruppen 1-3, 5 + 6	MMF
Substanz(en):	Medetomidin (Dorbene, Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz), Midazolam (Dormicum, Roche, Basel, Schweiz), Fentanyl

	(Fentanyl-Mepha, Mepha Pharma AG, Basel, Schweiz)
Dosierung:	0,5mg/kg Medetomidin; 5mg/kg Midazolam; 0,05mg/kg Fentanyl
Volumen:	0,5ml/kg Dorbene, 1ml/kg Dormicum, 1ml/kg Fentanyl-Mepha → Verdünnt mit 7,5ml Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) → Gesamt-Injektionsvolumen =10ml/kg

**Tabelle 10: Anästhesieprotokoll MMF**

Gruppe 4	Xylazin-Ketamin
Substanz(en):	Xylazin (Xylasol, Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz), Ketamin (Ketasol-100, Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz)
Dosierung:	13mg/kg Xylazin, 65mg/kg Ketamin
Volumen:	0,65ml/kg Xylasol; 0,65ml/kg Ketasol-100 → Verdünnt mit 8,7ml Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) → Gesamt-Injektionsvolumen =10ml/kg

**Tabelle 11: Anästhesieprotokoll Xylazin-Ketamin**

### 3.2.3.4. Mausstamm

Die Gruppen 1-4 und 6 wurde der Mausstamm C57BL/6J verwendet, in Gruppe 5 der Stamm BALB/c.

### 3.2.3.5. Externe Wärmezufuhr

Alle Tiere wurden auf einer elektrischen Wärmematte (World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg, Deutschland) positioniert. Diese war konstant auf 37 Grad Celsius temperiert.

Um den Einfluss der externen Wärmezufuhr auf die Kataraktformation zu untersuchen erhielten die Tiere der Gruppe 6 zusätzlich zur Wärmematte eine Wärmezufuhr durch ein Temperaturmanagementsystem (= TMS) bestehend aus einer Wärmeeinheit (3M™ Bair hugger™ Total Temperature Management System Modell 775, 3M Schweiz GmbH, Rüschlikon, Schweiz) und einer Wärmedecke (3M™ Bair hugger™ Small Lower Body Blanket 53700, 3M Schweiz GmbH, Rüschlikon, Schweiz) (Abbildung 13). Die Wärmeeinheit erzeugte einen warmen

Airflow, which passes through a tube into the warming blanket and is released from small holes on the underside. The warming unit was set to the lowest air flow rate and 43 degrees Celsius. The warming blanket covered the entire treatment table. For the individual duration of the ophthalmological examinations, the mice were placed on the electrical warming mat under the warming blanket.



**Abbildung 13: Aufbau Temperaturmanagementsystem (=TMS) der Gruppe 6 (unter dem Untersuchungstisch positionierte Wärmeeinheit leitet warmen Luftstrom durch Schlauch in Wärmedecke, welche Untersuchungstisch und Maus bedeckt)**

### 3.2.3.6. Zusammenfassende Darstellung

Gruppe	Cornea-befeuchtung	Mydriatikum	Anästhesie-protokoll	Stamm	Externe Wärmezufuhr
1	Protokoll 1	Tropicamid	MMF	C57BL/6J	Wärmematte
2 (nur OD)	Protokoll 2	Tropicamid	MMF	C57BL/6J	Wärmematte
2 a (nur OS)	Protokoll 3	Tropicamid	MMF	C57BL/6J	Wärmematte
2 b (nur OS)	Protokoll 4	Tropicamid	MMF	C57BL/6J	Wärmematte
3	Protokoll 2	Tropicamid + Atropin	MMF	C57BL/6J	Wärmematte

4	Protokoll 2	Tropicamid	Xylazin-Ketamin	C57BL/6J	Wärmematte
5	Protokoll 2	Tropicamid	MMF	BALB/c	Wärmematte
6	Protokoll 2	Tropicamid	MMF	C57BL/6J	Wärmematte + TMS

**Tabelle 12: Übersicht über die verschiedenen Gruppen, rot hervorgehoben die jeweils veränderten Versuchsbedingungen gegenüber der kursiv dargestellten Kontrollgruppe**

### 3.2.4. Verfahren nach der Allgemeinanästhesie

Gruppe 1 wurde 55-60 Minuten nach Ausfall des Aufrichtreflexes via intraperitonealer Pentobarbital-Injektion (Esconarkon ad us. Vet, Streuli Tiergesundheit AG, Uznach, Schweiz) (150mg/kg KGW) und Entblutung der Vena cava caudalis euthanasiert.

Den Tieren der Gruppen 2-6 wurden nach 55-60 Minuten subkutan die Antagonisten der jeweiligen Anästhesieprotokolle (Tabelle 13 und 14) verabreicht. Während der Aufwachphase wurde das Allgemeinbefinden der Tiere überwacht und in regelmässigen Abständen wurde die Linse unter Spaltlampenbeleuchtung auf Anzeichen einer Katarakt untersucht. Am nun wachen Tier war dies aufgrund von Abwehrbewegungen nicht so detailliert möglich wie zuvor am anästhetisierten Tier. 22-26h nach Durchführung der Versuche wurden die Tiere der Gruppen 2-6 entsprechend dem Verfahren in Gruppe 1 euthanasiert.

Antagonisten MMF:	
Substanz(en):	Atipamezol (Alzane ad us vet, Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz), Flumazenil (Anexate, Roche, Basel, Schweiz), Naloxon (Naloxon OrPha, OrPha Swiss GmbH, Küsnacht, Schweiz)
Verabreichungsweg:	Subkutan
Dosierung:	2,5mg/kg Atipamezol; 0,5mg/kg Flumazenil; 1,2mg/kg Naloxon
Volumen:	0,5ml/kg Alzane, 5ml/kg Anexate, 3ml/kg Naloxon OrPha → Verdünnt mit 1,5ml Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) → Gesamt-Injektionsvolumen 10ml/kg

**Tabelle 13: Antagonisierung MMF-Anästhesie**

Antagonisten	
Xylazin-Ketamin:	
Substanz:	Atipamezol (Alzane ad us vet, Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz)
Verabreichungsweg:	Subkutan
Dosierung:	2.5mg/kg Atipamezol
Volumen:	0.5ml/kg Alzane → Verdünnt mit 9,5ml Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchloridlösung ad us vet, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) → Gesamt-Injektionsvolumen 10ml/kg

**Tabelle 14: Antagonisierung Xylazin-Katamin-Anästhesie**

### 3.2.4.1. Nekropsie und Histologie

Unmittelbar nach dem Tod der Tiere wurden die Augen entnommen. Der komplette Augapfel wurde in 10% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschliessend wurden die Augen in Parafinblöcke eingebettet. Von den Augen der Gruppe 1 und 2 wurden pro Auge 6 Hämatoxilin-Eosin-gefärbte Schnitte im Abstand von jeweils 300µm angefertigt. Diese wurden unter 40facher Vergrösserung mit einem Mikroskop auf pathologische Veränderungen untersucht.

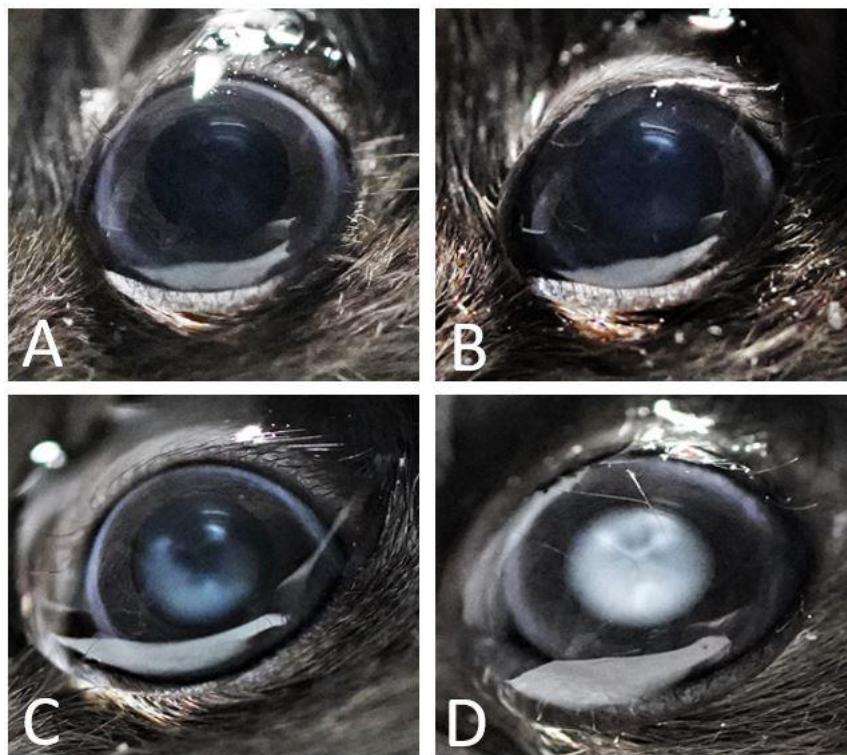
### 3.2.5. Beurteilung der Befunde der ophthalmologischen Untersuchungen

Die Beurteilung der Katarakt und ihrer Entwicklung erfolgte anhand verschiedener Parameter der Spaltlampen- und OCT-Untersuchungen und derer semiquantitativer oder quantitativer Bewertung.

#### 3.2.5.1. Spaltlampenbefunde

Die Katarakt wurde anhand der Spaltlampenuntersuchung semiquantitativ wie folgt graduiert:

- Grad 0 = Keine Trübung der Linse (Abbildung 14A)
- Grad 1 = Incipiente Katarakt (Abbildung 14B)
- Grad 2 = Immature Katarakt (Abbildung 14C)
- Grad 3 = Mature Katarakt (Abbildung 14D)



**Abbildung 14:** Beispiele für semiquantitative Beurteilung der Katarakt A = Grad 0, B = Grad 1, C = Grad 2, D = Grad 3, Bilder entstanden im Rahmen dieser Arbeit

Die quantitative Beurteilung der AKfB in Prozent konnte unmittelbar für die Ergebnissauswertung übernommen werden.

### 3.2.5.2. OCT-Aufnahmen

Für die Auswertung der OCT-Aufnahmen wurde ein horizontaler B-Scan mittig des maximalen, vertikalen Pupillendurchmessers der En-face-Aufnahme der Linse ausgewählt. Mit Hilfe der 2D-Analysefunktion der CASIA2 Software wurden die ausgewählten Scans wie folgt bearbeitet und verschiedene Parameter vermessen:

#### Ausschalten der Tracing-Funktion

Die CASIA2-Software verfügt über eine automatische Erkennung von Geweben im Auge wie der Cornea und Linsenoberfläche und markiert diese für automatische Ausmessungen und Analysen verschiedener Parameter, sowie die Korrektur des Brechungsindex der Linse mittels Spurlinien (= Tracing-Funktion). Da diese Funktion für das menschliche Auge entwickelt wurde, war sie am deutlich kleineren Mausauge meist fehlerbehaftet. Eine fehlerhafte Einzeichnung dieser Spurlinien führte dazu, dass posteriore Bildausschnitte der horizontalen B-Scans überlagert wurden und das Auge nicht mehr vollständig abgebildet war. Nach Ausschalten dieser Tracing-Funktion konnte das Mausauge vollständig dargestellt und manuell

vermessen werden.

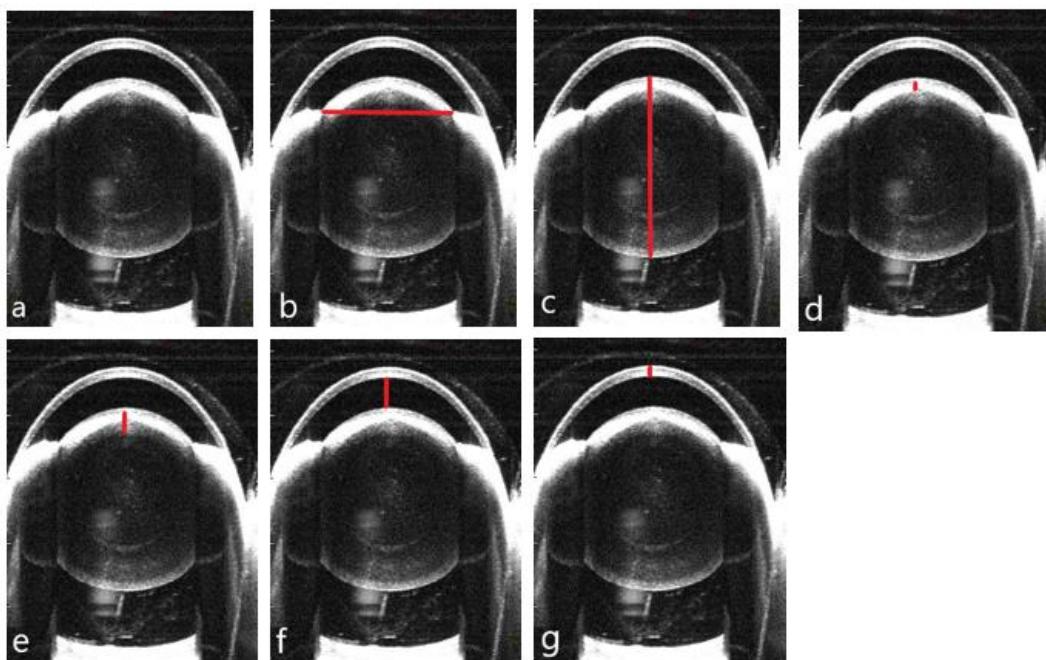
### **Anpassung der Bildeinstellungen**

Für eine bessere Detailauflösung der ausgewählten B-Scans wurde die Helligkeitsstufe 14 mit einem Kontrast von 20 ausgewählt.

### **Ausgemessene Parameter**

Folgende Parameter konnten mithilfe der integrierten Software durch das Hinzufügen einer geraden Linie zwischen zwei Punkten ausgemessen werden:

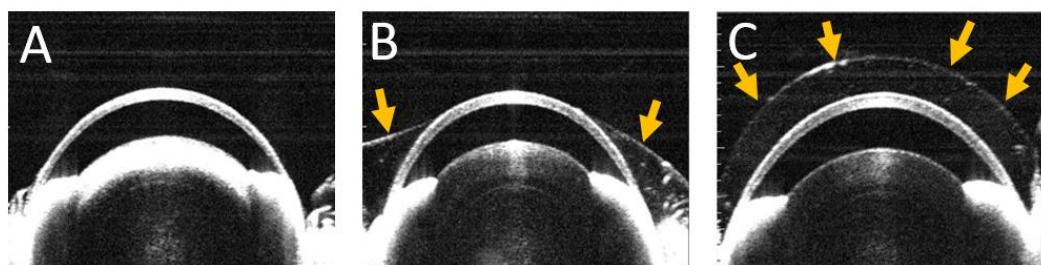
- 1) Maximale Pupillenweite (Abbildung 15b): Zwischen den pupillenbegrenzenden Endpunkten der Iris
- 2) Maximaler Linsendurchmesser (Abbildung 15c): Vom anterioren zum posterioren Linsenpol (rechtwinklig zur Pupillenweite)
- 3) Maximale Grösse der - im Vergleich zum physiologischen Linsengewebe - hyperreflektiven Bereiche des anterioren Lisenkortex:  
Infolge unterschiedlicher Signalintensitäten wurde differenziert zwischen Bereichen welche der Reflektivität der Iris entsprechen (Abbildung 15d) (im folgenden als IRB bezeichnet) und jenen welche zudem schwächere Reflektivitäten miteinschliessen (Abbildung 15e) (=»sämtliche hyperreflektive Bereiche » im folgenden als SHB bezeichnet):
  - a) IRB: Zwischen anteriorem und posteriorem Rand irisgleich-reflektiver Bereiche (Im rechten Winkel und auf halber Länge der bereits ausgemessenen Pupillenweite)
  - b) SHB: Zwischen anteriorem und posteriorem Rand sämtlicher hyperreflektiver Bereiche (Im rechten Winkel und auf halber Länge der bereits ausgemessenen Pupillenweite)
- 4) Augenkammertiefe (Abbildung 15f): Vom Corneaendothel bis zur anterioren Lisenkapsel (Rechtwinklig zur Pupillenweite)
- 5) Corneadicke (Abbildung 15g): Zwischen Corneaepithel und -endothel (Rechtwinklig zur Pupillenweite)



**Abbildung 15:** a) B-Scan ohne Vermessung b-g) B-Scan mit Vermessung von:  
b) Pupillenweite, c) Linsendurchmesser, d) IRB, e) SHB, f) Augenkammertiefe, g) Corneadicke

Die Verteilung der Augentropfen wurde pro Messzeitpunkt auf allen 256 horizontalen B-Scans ausgewertet. Die Befunde wurden nach folgenden Kriterien in eine numerische Skala umgewandelt:

- 0: Keine Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche der B-Scans erkennbar (Abbildung 16a)
- 1: Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche einzelner B-Scans oder Abschnitten von B-Scans vorhanden (Abbildung 16b)
- 2: Flüssigkeitsfilm auf der gesamte Corneaoberfläche aller B-Scans (Abbildung 16c)

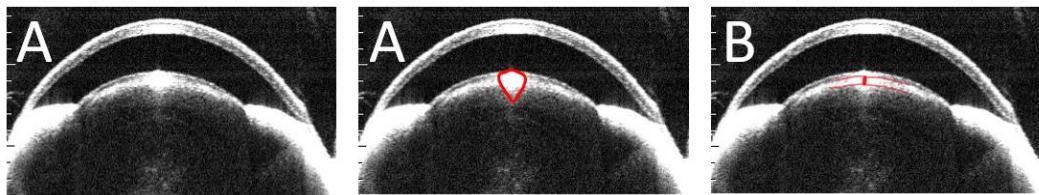


**Abbildung 16:** Beispiel für Skalierung Corneabefeuchtung; A=0, B=1, C=2, Pfeile= Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche

#### Laserbedingte Artefakte:

Hyperreflektive Artefakte am anterioren Linsenpol wurden bei der Ausmessung der IRB und SHB aussenvor gelassen, indem seitlich des Artefakts befindliche

Gewebereflektivitäten durch das Artefakt hindurch verbunden und die entsprechenden Ausmessungen der jeweiligen Parameter am Schnittpunkt dieser Verbindungsgeraden durchgeführt wurden (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Beispiel Laserartefakt a) ohne und mit Markierung, b) Ausmessung IRB ohne Artefakt**

### 3.3. Statistik

#### 3.3.1. Datenerfassung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Statistiker Dr. Guido Steiner (Statistiker bei F.Hoffmann La Roche Ltd.). Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel 2016 in ein zur Analyse geeignetes Format gebracht, graphisch dargestellt und mithilfe der Statistik-Programmiersprache R (Version 4.0.5(90), inklusive geeigneter Zusatzpakete) bearbeitet und ausgewertet. Aus R resultierende Graphiken und Tabellen wurden durch die rmarkdown-Bibliothek im HTML-Format ausgegeben und konnten somit in diese Arbeit übernommen werden.

#### 3.3.2. Datenanalyse

Da die beiden Augen eines Tieres getrennt voneinander untersucht werden können, erfolgte auch die Datenauswertung mit Differenzierung zwischen dem linken und rechten Auge anstatt auf Tierebene.

Die Kataraktinzidenzen wurden in Bezug auf die Augenzahl der jeweiligen Gruppen prozentual berechnet.

Für die Vergleiche der Tiere und Gruppen wurde die longitudinale Abhängigkeit und die geschachtelte Struktur der Daten (wiederholte Messungen am selben Tier und 2 Augen für jedes Tier) in den statistischen Modellen berücksichtigt. Um die Analyse der Zeitreihendaten zu vereinfachen und interpretierbare Messwerte zu erhalten, wurden mehrere Aggregationen dieser Daten implementiert, welche die Befunde auf Ebene der einzelnen Augen zusammenfassen. So wurden Area-under-the-curve-Werte (=AUC) für alle Kataraktmerkmale (Grad, AKfB und SHB/IRB)

eingeführt. Diese Werte kombinieren den erreichten Grad der Katarakt, die erreichte AKfB oder Grösse der IRB/SHB mit der Dauer deren Bestehens. Sie wurden durch die numerische Integration von LOESS-geglätteten (=“locally weighted scatterplot smoothing“) Zeitkurven erhalten. Somit resultiert für jedes Auge ein Wert, welcher die Kataraktformation als Fläche unter der Kurve repräsentiert. Mit Hilfe dieser Werte konnten Unterschiede der Kataraktformation infolge der einzelnen gruppenspezifischen Versuchsbedingungen, sowie die Korrelation der Befunde der Versuchsgruppen vergleichend untersucht werden. Weiterhin wurden folgende Größen zur Beurteilung herangezogen: Maximal erreichte/r Grad/AKfB/IRB/SHB während der Anästhesie, Anzahl der Fälle mit Grad 2 oder höher, Anzahl der Feststellung von Grad 3 und der früheste Zeitpunkt an dem Grad 2 bzw 3 festgestellt wurde.

Paarweise Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und den Vergleichsgruppen (= Kontraste) erfolgten in der Regel im Rahmen von „mixed effect models“ für longitudinale Daten. Im Gegensatz zur einfachen Varianzanalyse (analysis of variance, kurz ANOVA) können diese Modelle auch einen für jedes Tier spezifischen Offsets der Messwerte und die statistische Abhängigkeit der Ergebnisse in den beiden Augen eines Tieres berücksichtigen. Ansonsten erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen der Studie ähnlich wie bei der ANOVA durch geeignete post-hoc-Tests.

Die Beeinflussung der Kataraktentwicklung aufgrund gruppenspezifischer Unterschiede konnte mit der geplanten Tierzahl nur für sehr große Effekte mit statistischer Signifikanz gezeigt werden. Generell wurden p-Werte unter 0,05 (=Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art= 5%) als statistisch signifikant angesehen.

Bei Mehrfachtests und Vergleichen der p-Werte innerhalb eines jeweiligen Vergleichpaars wurden die p-Werte für jede Datenaggregation mit Hilfe der Holm-Methode angepasst, um die Wahrscheinlichkeit eines zufällig signifikanten Ergebnisses zu kontrollieren. Für Mehrfachvergleiche mit lediglich einer Kontrolle (Viele-zu-eins-Vergleiche) erfolgte im Falle der Kataraktrückentwicklung die p-Werte-Anpassung mit Hilfe der Dunnett-Methode.

Die Analyse der Gruppen 2a und 2b musste getrennt durchgeführt werden, um eine ordnungsgemäße paarweise Prüfung (linkes gegen rechtes Auge innerhalb eines Tieres) zu erreichen.

Da die Messzeitpunkte für den Grad und die AKfB aus Gruppe 1 nicht exakt mit denen der restlichen Gruppen übereinstimmten, wurde die Zeitskala um 2-3 Minuten versetzt. Dies sollte allerdings keinen erheblichen Einfluss auf die zusammengefassten Bewertungen oder Analysen haben. Auch die Messzeitpunkte der OCT-Aufnahmen wurden, um sie mit den Befunden der Spaltlampenuntersuchung (Grad und AKfB) vergleichen zu können, in Gruppe 1 um 2 Minuten nach hinten und in den Gruppen 2-6 um 3 Minuten nach vorne verschoben. Somit wurde eine „harmonisierte“ Zeitachse erstellt, in welcher die OCT-Messzeitpunkte der jeweils naheliegensten Spaltlampenuntersuchung gleichgestellt wurden.



## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Versuchstiere**

Alle Mäuse zeigten ein gutes Allgemeinbefinden in Form eines aufmerksamen Verhaltens, einer physiologischen Körperhaltung, einem agilen Bewegungsablauf und gutem Pflegezustand. Das Körpermassenzentrum der Mäuse nahm im Laufe der Akklimatisierungsphase zu und die Tiere hatten am Versuchstag ein Gewicht von  $21,3 \pm 0,61$  Gramm. 2 Augen mussten in Folge der Spaltlampenuntersuchung vor Versuchsbeginn aus der Studie ausgeschlossen werden: Ein Auge aufgrund eines Mikrophthalmos, da ein solcher mit einer Veränderung weiterer okularer Strukturen einhergehen kann (91) und ein Auge aufgrund einer anterioren Synechie, welche eine vollständige Untersuchung per Spaltlampe verhindern kann (92). Da das jeweils kontralaterale Auge keine Pathologien aufwies, wurden diese mit in die Studie aufgenommen. Die Daten der Kataraktformation konnten somit von 194 der 196 Augen ausgewertet werden.

Die in Anhang 1 aufgeführten OCT-Messzeitpunkte wurden aufgrund von Laser-/Bewegungsartefakten oder aufgrund mangelnder Bildschärfe aus der Datenanalyse ausgegrenzt. Mit Hilfe der restlichen Messzeitpunkte der jeweiligen Augen konnte lückenübergreifend eine Ausmessung der verschiedenen Parameter erfolgen. Folglich musste kein Auge gänzlich aus der OCT-Auswertung ausgeschlossen werden.

### **Hintergrundbefunde**

Im Rahmen der OCT-Auswertung wurden punktförmige, hyperreflektive Veränderungen bei 173 Linsen im Nukleus und bei 7 Linsen im Kortex festgestellt. In der Spaltlampenuntersuchung stellten sich diese als multifokale, gräulich-weissliche Punkte dar. Des Weiteren erschienen die Linsenkerne von 6 Linsen in der Spaltlampenuntersuchung diffus gräulicher als dies bei den restlichen Linsen der Fall war. Da diese gräulichen Bereiche transparent waren, kann nicht von einer Katarakt gesprochen werden. In 2 Augen wurden scharf abgegrenzte, fokale, nukleäre Katarakte festgestellt.

Da angenommen wird, dass es sich bei diesen Veränderungen um kongenitale Pathologien handelt, welche keinen Einfluss auf die potentielle Formation einer während der Allgemeinanästhesie erworbenen Katarakt haben, stellten diese kein

Ausschlusskriterium für die Studie dar. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung, dass keiner der Befunde sich im Laufe der Versuchsdurchführung veränderte.

#### 4.2. Gruppenübergreifende Befunde

Das folgende Kapitel befasst sich mit den gruppenübergreifend festgestellten Befunden der Kataraktentwicklung während und nach der Allgemeinanästhesie.

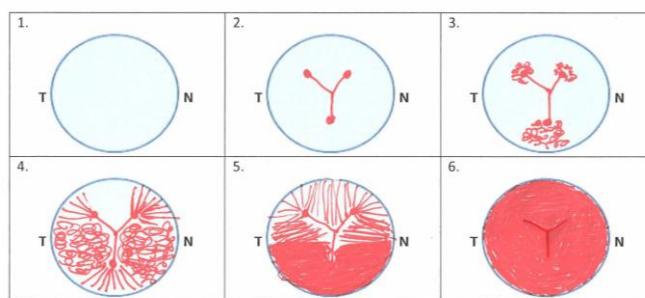
##### 4.2.1. Verlauf während der Allgemeinanästhesie

Die Katarakt trat während der Allgemeinanästhesie insgesamt mit einer Inzidenz von 96.91% auf und wurde erstmals durchschnittlich 15.7 Minuten nach Ausfall des Aufrichtreflexes beobachtet.

Die Kataraktformation erfolgte stets nach dem folgenden, einheitlichen Schema:

###### Spaltlampenuntersuchung:

Der Beginn der Kataraktentwicklung äusserte sich durch das Hervortreten der anterioren Linsennahtlinien als gräulich-weissliche, Y-förmige Struktur. Von den punktförmig hervorgehobenen Enden dieser ausgehend, breitete sich die Trübung mit zunehmender Intensität im umgebenden Linsenkortex in die Peripherie aus. Final erschien der gesamte anteriore Bereich der Linse bei frontaler Betrachtung getrübt. Eine Beispielhafte Darstellungen des Verlaufes der Kataraktausbreitung ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Beispielhafter Verlauf der Kataraktformation bei frontaler Betrachtung mittels Spaltlampe über 6 Untersuchungszeitpunkte, 1: Keine Katarakt, 2: Anteriore Linsennahtlinien mit hervorgehoben, punktförmigen Enden, 3: Beginn Ausdehnung der Trübung in den peripheren Linsenkortex, 4: Fortschreiten der Ausdehnung 5: Ausdehnung in gesamter Linse mit unterschiedlicher Intensität, 6: Gesamte Linse vollständig getrübt (T= Temporal, N= Nasal)**

OCT-Untersuchung:

Auf den B-Scans äusserte sich die Formation der Katarakt zu Beginn in Form einer gesteigerten Reflektivität subkapsulärer Gewebebeschichten nahe des anterioren Linsenpols. Davon ausgehend breitete sich der hyperreflektive Bereich mit fortschreitender Anästhesiedauer innerhalb der anterior-kortikalen Schichten in Richtung Linsenkern und der equatorialen Zone aus (Abbildung 19). Die Intensität des hyperreflektiven Signals nahm sekundär zu, was sich in Form einer zeitlich versetzten, räumlichen Ausdehnung der SHB (= sämtliche hyperreflektive Bereiche), gefolgt von jener der IRB (= irisgleich reflektive Bereiche) äusserte (Abbildung 19).

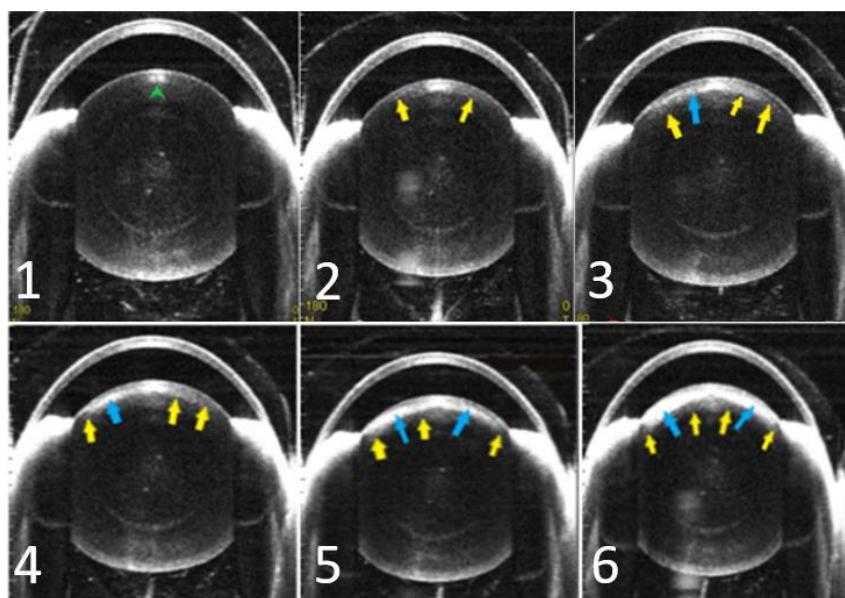


Abbildung 19: Beispielhafte Kataraktentwicklung über alle Messzeitpunkte (1= 5min, 2= 15min, 3=25min, 4=35min, 5=45min, 6=55min), Grüne Pfeilspitze= Laserartefakt (bei jedem Zeitpunkt gleichbleibend, zur besseren Übersicht nur auf Graph 1 dargestellt), gelber Pfeil= SHB, blauer Pfeil= IRB

#### 4.2.2. Verlauf nach Beenden der Allgemeinanästhesie

Nach Beenden der Anästhesie konnte in allen untersuchten Linsen bei Spaltlampenbetrachtung ein Rückgang der Trübung und eine vollständige Wiederherstellung der Transparenz beobachtet werden (siehe auch Abbildung 77 Anhang 2.2). Im Durchschnitt konnte die Katarakt bereits 106.56 Minuten nach Anästhesiebeginn nicht mehr detektiert werden.

Die Rückentwicklung der Katarakt erfolgte ebenfalls nach einem einheitlichen Schema: Zu Beginn konnte unter Spaltlampenbetrachtung eine punktförmige Aufklärung im Zentrum der Trübung beobachtet werden, welche sich in Richtung

der equatorialen Zone ausbreitete. Am längsten konnte die Katarakt im inferioren-nasalen Augenwinkel, nahe der equatorialen Zone detektiert werden. Dieser Verlauf war unabhängig vom zuvor erreichten, maximalen Ausprägungsgrad der Katarakt.

#### **4.3. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen**

Im Folgenden werden die Befunde der ophthalmologischen Untersuchungen während der Anästhesie dargestellt. Sowohl der erste als auch der zweite Versuchsteil ist gegliedert in die Kataraktformation, den Linsendurchmesser, die Augenkammertiefe, die Corneadicke, den Flüssigkeitsfilm auf der Corneaoberfläche, die Mydriasis und die Körpertemperatur. Im Anschluss werden die Befunde der Katarakt nach Beenden der Anästhesie und der histologischen Untersuchung dargestellt.

##### **4.3.1. Versuchsteil 1: Verschiedene Cornea-Befeuchtungsprotokolle**

Der Einsatz einer 1ml-Feindosierungsspritze in Gruppe 1 (Protokoll 1) wird mit dem Einsatz einer Pipette in Gruppe 2 (OD) (Protokoll 2) verglichen. Zudem erfolgt ein tierinterner Vergleich verschiedener Substanzen der Gruppen 2a (OD) (Protokoll 2, Hypromellose- und Natriumchloridlösung); Gruppe 2a (OS) (Protokoll 3, Natriumhyaluronat-Augengel), beziehungsweise der Gruppe 2b (OD) (Protokoll 2, Hypromellose- und Natriumchloridlösung), Gruppe 2b (OS) (Protokoll 4, Natriumchloridlösung).

###### **4.3.1.1. Kataraktformation**

Die Kataraktinzidenz lag in Gruppe 1 bei 100%, in Gruppe 2 (OD) bei 94.4%. Die Gruppe 2a (OD) zeigte eine Kataraktinzidenz von 100%, Gruppe 2a (OS) von 44.4%. Gruppe 2b (OS) wies eine 100%ige, Gruppe 2b (OD) eine 88.8%ige Inzidenz vor.

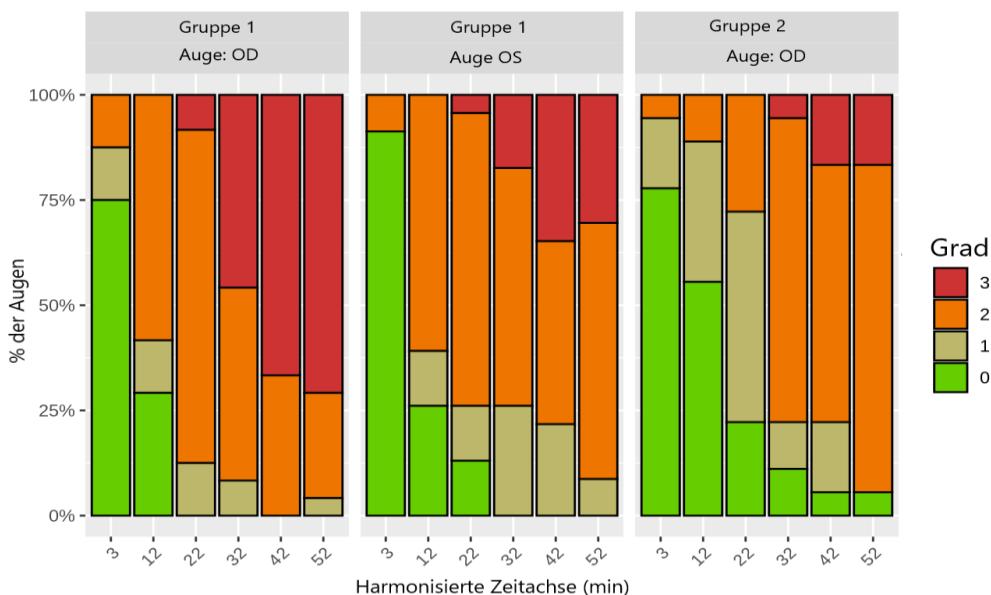
###### **Spaltlampenergebnisse:**

###### **Graduierung Katarakt**

Abbildung 22 am Ende dieses Abschnittes veranschaulicht die im folgenden geschilderten Unterschiede des Verlaufes der Gradientwicklung der einzelnen Gruppen gegenüber ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe.

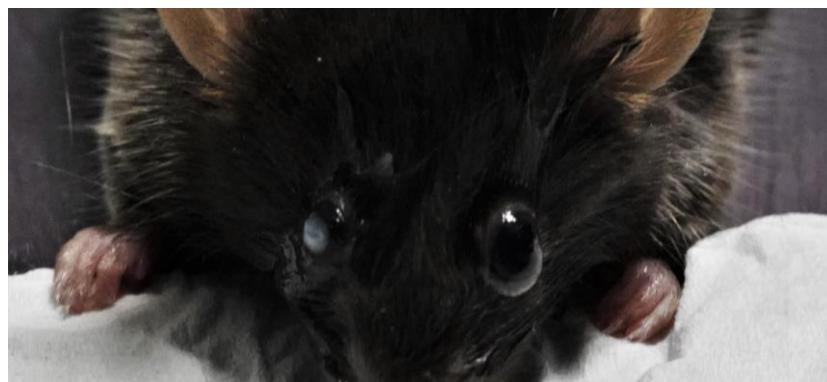
In Gruppe 1 wurde zu Beginn der Anästhesie eine gegenüber der Gruppe 2 (OD)

deutlichere Zunahme der Kataraktgrade beobachtet (siehe Abbildung 22A). Mit fortschreitender Dauer der Anästhesie schwächte diese Zunahme in Gruppe 1 ab. Gegen Ende der Anästhesie näherte sich der Kataraktgrad der Gruppe 1 einem konstanten Wert. Demgegenüber konnte in Gruppe 2 (OD) im Verlauf der Anästhesie eine nahezu kontinuierliche Zunahme der Kataraktgrade beobachtet werden. Verglichen mit Gruppe 1 waren die absoluten Werte der durchschnittlichen Kataraktgrade in Gruppe 2 (OD) zu allen Untersuchungszeitpunkten milder. Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich auch bei Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Grade (Abbildung 20): In beide Gruppen verschoben sich die Häufigkeiten mit fortschreitender Anästhesiedauer in Richtung schwerwiegenderer Grade, wobei Gruppe 2 (OD) dies zu allen Zeitpunkten in milderem Ausmass zeigte.



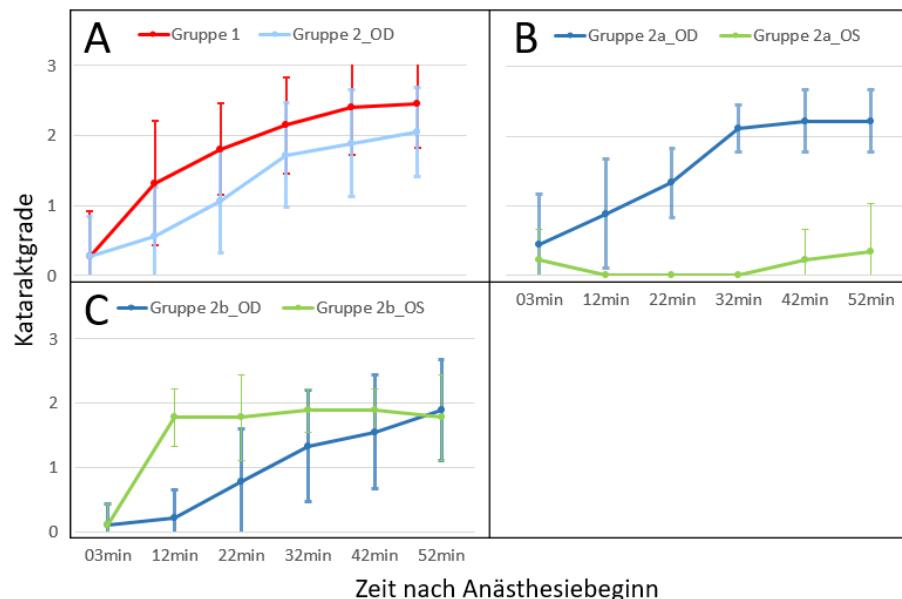
**Abbildung 20: Darstellung Gradverteilung über die Dauer der Anästhesie der Gruppen 1 und Gruppe 2 (OD)**

Während die Kataraktgrade der Gruppe 2a (OD) in der ersten Anästhesiehälfte kontinuierlich zunahmen und sich dann einem gleichbleibenden Wert annäherten, konnte in Gruppe 2a (OS) zwischen der ersten und zweiten Untersuchung ein Rückgang der zuvor detektierten Trübungen festgestellt werden (Abbildung 22B). Erst zum Zeitpunkt  $t = 42$  Minuten war erneut eine Zunahme der Kataraktgrade der Gruppe 2a (OS) sichtbar. Die gravierenden Unterschiede zwischen beiden Linsen der Tiere dieser Gruppe konnten während der Versuchsdurchführung bereits ohne Zuhilfenahme einer Spaltlampe bemerkt werden (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Abbildung eines Tieres mit unterschiedlicher Kataraktformation der linken und rechten Linse, Linke Linse keine Katarakt (mit topikal auf die Cornea applizierter Flüssigkeit), rechte Linse mit Katarakt (ohne topikal applizierte Flüssigkeit)

In Gruppe 2b (OD) erfolgte eine nahezu konstant progressive Zunahme der Kataraktgrade (Abbildung 22C). Demgegenüber konnte in Gruppe 2b (OS) zwischen der ersten und zweiten Untersuchung vergleichsweise ein deutlich stärkerer Anstieg der Grade beobachtet werden. Ab dem Zeitpunkt  $t = 12$  Minuten stagnierte die Entwicklung der Katarakt der linken Augen bei einem nahezu konstanten Wert, nach 42 Minuten war sie geringgradig rückläufig. Bis zum vorletzten Untersuchungszeitpunkt waren in den linken Augen schwerwiegendere Grade zu beobachten, beim letzten Zeitpunkt unterschieden sich die durchschnittlichen Grade beider Augen kaum.



**Abbildung 22:** Mittelwerte und Standardabweichung der Kataraktgrade während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b

**OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

Die Auswertung folgender Parameter unterstützt die beobachteten Unterschiede der jeweiligen Versuchsgruppen (Graphisch dargestellt in Abbildung 78 Anhang 3):

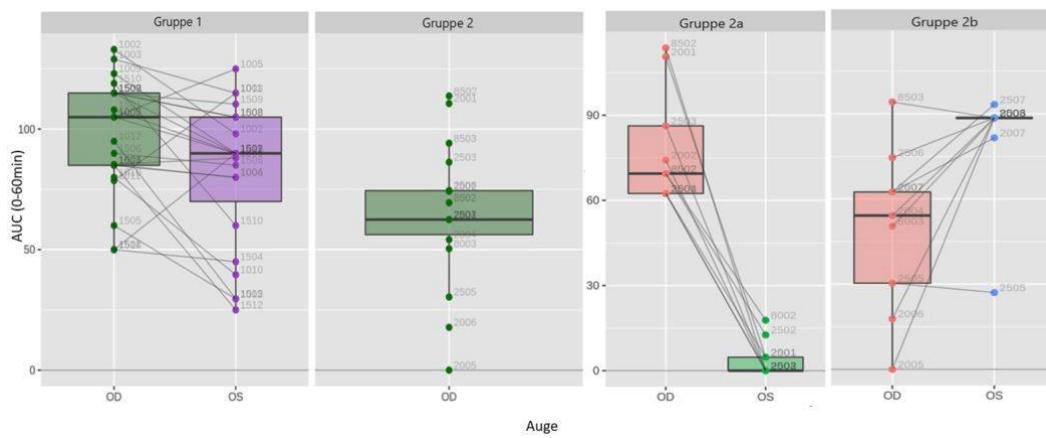
Der durchschnittlich erreichte AUC-Wert der Kataraktgrade der Gruppe 1 lag bei 90.3, der Gruppe 2 (OD) bei 64.29. Gruppe 1 übertraf mit einem durchschnittlichen maximalen Grad der Katarakt von 2.51 jenen der Gruppe 2 (OD) mit 2.06. Grad 2 und höher wurde in Gruppe 1 durchschnittlich 4.18mal, in Gruppe 2 (OD) 2.94mal beobachtet. Grad 3 wurde durchschnittlich 1.4mal in Gruppe 1 und 0.39mal in Gruppe 2 (OD) festgestellt. Gruppe 1 erreichte Grad 2 und höher durchschnittlich 12.58 Minuten früher als die Gruppe 2 (OD), Grad 3 durchschnittlich 3.17 Minuten früher.

Der durchschnittliche AUC-Wert der Kataraktgrade der Gruppe 2a (OS) betrug 4.42, der Gruppe 2a (OD) 79. Der durchschnittliche maximale Grad war mit einen Wert von 0.56 in den linken geringer als in den rechten Linsen mit 2.22. Grad 2 und höher wurde in den linken Linsen 0.11mal und in den rechten 3.67mal erreicht. In den linken Linsen wurde Grad 3 gar nicht beobachtet, in den rechten durchschnittlich 0.56mal. Da in den linken Linsen kaum eine Katarakt beobachtet wurde, konnten für einen Vergleich des frühesten Auftretens von Grad 2 und höher bzw Grad 3 nicht ausreichend viele Zahlenwerte erhoben werden.

Gruppe 2b (OS) hatte einen AUC-Mittelwert von 81.45, Gruppe 2b (OD) 49.58. Das früheste Auftreten von Grad 2 und höher erfolgte in den rechten Linsen durchschnittlich 23.75 Minuten später als in den linken. Für einen Vergleich des frühesten Auftretens von Grad 3 lagen in Gruppe 2b nicht ausreichende Datenmengen vor. Beide Augen zeigten denselben durchschnittlich maximal erreichten Grad von 1.89. In den linken Linsen wurde Grad 2 und höher durchschnittlich 4.33mal erreicht, in den rechten 2.22mal. Grad 3 wurde in den linken Linsen nicht erreicht, in den rechten durchschnittlich 0.22mal.

Aufgrund der geringen Tierzahlen in den Gruppen 2a und 2b konnten Unterschiede der Häufigkeitsverteilung in diesen Gruppen nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden.

Die Boxplot-Darstellung (Abbildung 23) verdeutlicht die Verhältnisse der AUC-Werte der Kataraktgrade der einzelnen Gruppen.



**Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der AUC-Werte der Kataraktgrade der Gruppen des ersten Versuchsteils**

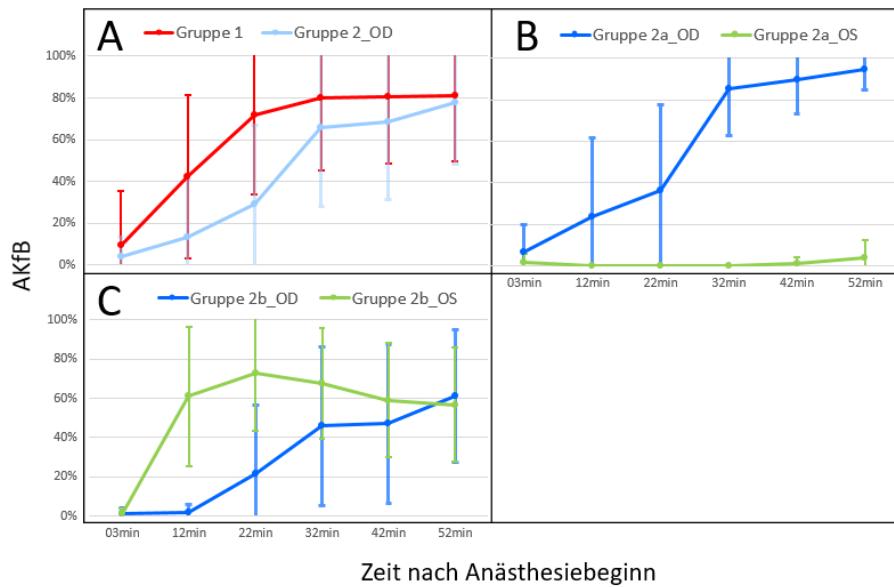
Ausdehnung der Katarakt bei frontaler Betrachtung (= AKfB):

Für die Auswertung der AKfB wurde der Verlauf, die durchschnittliche maximale AKfB und der AUC-Mittelwert herangezogen.

Abbildung 24A zeigt die Unterschiede des Verlaufes der AKfB der Gruppen 1 und 2 (OD): Zu Beginn der Anästhesie zeigte Gruppe 1 eine stärkere Zunahme der AKfB als Gruppe 2 (OD). Die Zunahme wurde in Gruppe 1 im Verlauf der Anästhesie geringer und stagniert ab dem vierten Messzeitpunkt bei einem konstanten Wert. In den rechten Linsen der Gruppe 2 konnte demgegenüber während der gesamten Anästhesie eine kontinuierlich progressive Zunahme der AKfB beobachtet werden, welche - mit Ausnahme eines sprunghaften Anstiegs zwischen dem dritten und vierten Untersuchungszeitpunkt - nahezu konstant verlief. Trotz Annäherung der Werte gegen Ende der Anästhesie erreichte Gruppe 1 während der gesamten Versuchsdurchführung vergleichsweise höhere Durchschnittswerte der AKfB.

Die Gruppe 2a (OS) zeigte keine deutliche Zunahme der AKfB im Verlauf der Anästhesie (Abbildung 24B). Demgegenüber stieg die AKfB der rechten Linsen während der gesamten Anästhesiedauer.

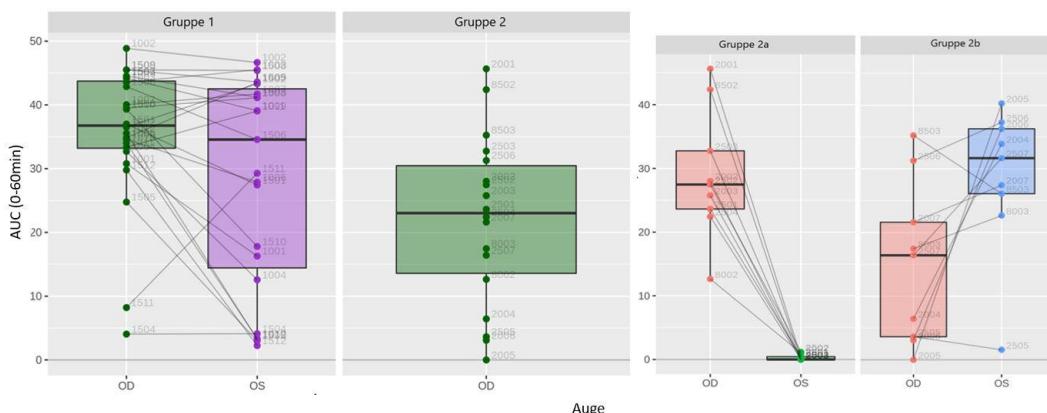
In Gruppe 2b (OS) konnte zu Beginn der Anästhesie eine stärkere Ausdehnung der Katarakt verglichen mit den rechten Linsen derselben Gruppe beobachtet werden (Abbildung 24C). Auffallend war zudem ein Rückgang der AKfB in den linken Linsen ab dem dritten Untersuchungszeitpunkt. In den rechten Linsen hingegen nahm die Ausdehnung nahezu kontinuierlich zu.



**Abbildung 24: Mittelwerte und Standardabweichung der AKfB während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

Die durchschnittlich maximale Ausdehnung der Katarakt betrug in Gruppe 1 86,1%, in Gruppe 2 (OD) 82.56%. In Gruppe 2a (OS) erreichte die AKfB einen Wert von 6%, in den rechten Linsen derselben Gruppe 95%. In Gruppe 2b lag die maximal erreichte AKfB bei 80% in den linken und 71% in den rechten Linsen.

Der durchschnittliche AUC-Wert der Gruppe 1 lag bei 32.17, der der Gruppe 2 (OD) bei 22. In Gruppe 2a (OS) wurde ein Wert von 0.35, in Gruppe 2a (OD) von 28.97 errechnet. In Gruppe 2b (OS) betrug der Wert 28.58 und Gruppe 2b (OD) 15.02. Die Verhältnisse der AUC-Werte sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Box-Plot-Darstellung der AUC-Werte der AKfB der Gruppen**

**des ersten Versuchsteils****OCT-Ergebnisse:**

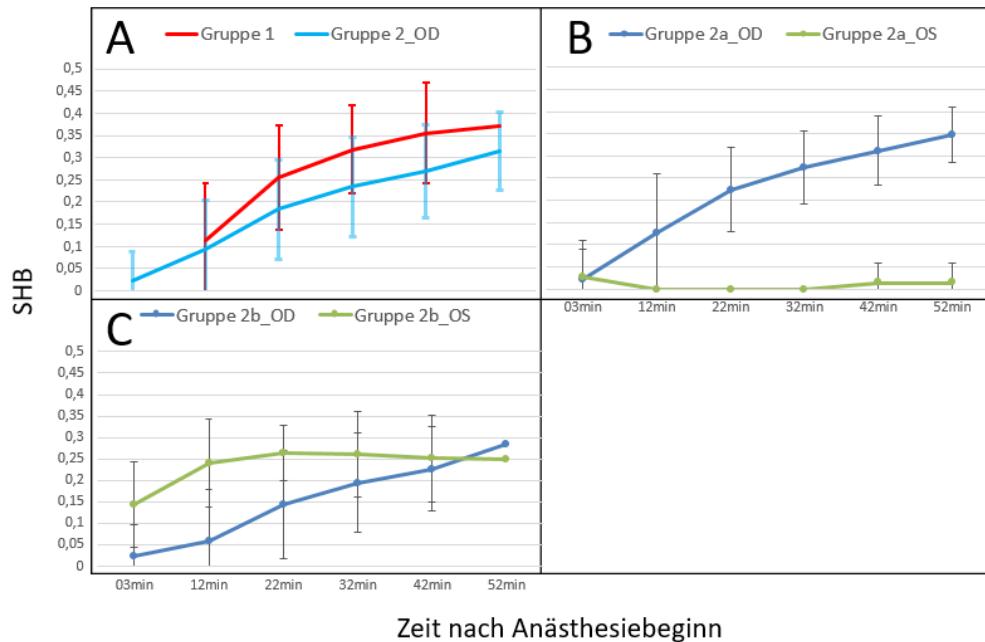
Mit zunehmender Erfahrung des Untersuchers im Verlauf der Studie konnte die Dauer der ersten Spaltlampenuntersuchung reduziert werden. Dies ermöglichte, anstelle der 5 OCT-Aufnahmen in Gruppe 1, in den Gruppen 2-6 6 Aufnahmen anzufertigen. Zur Auswertung wurde der gruppendurchschnittliche Verlauf, die maximale Grösse und die AUC-Werte herangezogen.

**Sämtliche hyperreflektive Bereiche (= SHB):**

Die Ausmessung der SHB in Gruppe 1 und Gruppe 2 (OD) liess im Verlauf der Anästhesie eine kontinuierliche Zunahme beobachten, wobei Gruppe 1 durchschnittlich höhere Werte aufwies (Abbildung 26A).

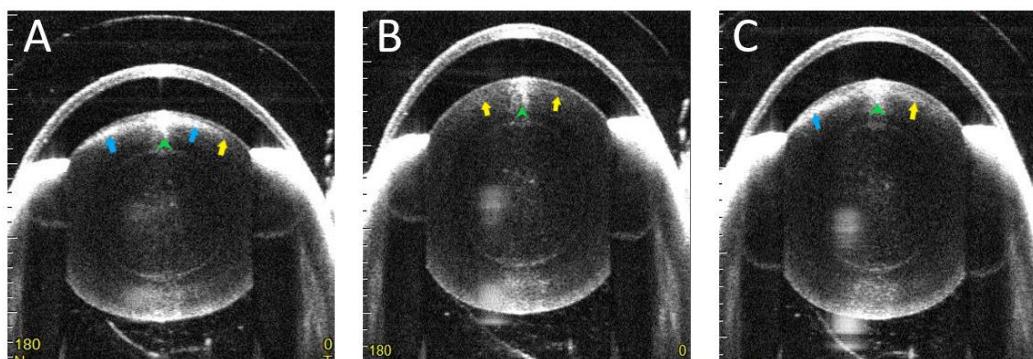
In Gruppe 2a (OD) stieg der Wert kontinuierlich während des gesamten Anästhesieverlaufes, wohingegen in Gruppe 2a (OS) zwischen dem ersten und zweiten Messzeitpunkt eine rückläufiger Verlauf zu erkennen war (Abbildung 26B). Erst nach 42 Minuten konnte in den linken Linsen ein erneuter, minimaler Anstieg festgestellt werden.

In Gruppe 2b (OS) wurden, verglichen mit den kontralateralen Augen, zu Beginn der Anästhesie eine stärkere Zunahme und folglich höhere absolute Werte detektiert (Abbildung 26C). Nach t= 22 Minuten sanken die Durchschnittswerte der linken Linsen bis zum Beenden der Anästhesie geringgradig ab, wohingegen in den rechten Linsen ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet wurde.



**Abbildung 26:** Mittelwerte und Standardabweichung der SHB während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)

Eine temporäre oder persistierende Rückentwicklung der Katarakt der Gruppen 2a (OS) und 2b (OS) äusserte sich auf den OCT B-Scans in Form einer Abnahme der Intensität der Reflektivitätsstufe oder gar einem gänzlichem verschwinden hyperreflektiver Bereiche (Beispiel siehe Abbildung 27). Diese Rückentwicklung konnte gemäss der Entwicklungsrichtung ausgehend von den anterioren Kortexschichten in Richtung weiter nuklear befindlicher Kortexbereiche und der equatorialen Zone beobachtet werden. Im Falle einer anschliessenden, erneuten Progression der Gruppe 2a (OS) entsprach der Verlauf jenem der Kataraktformation.

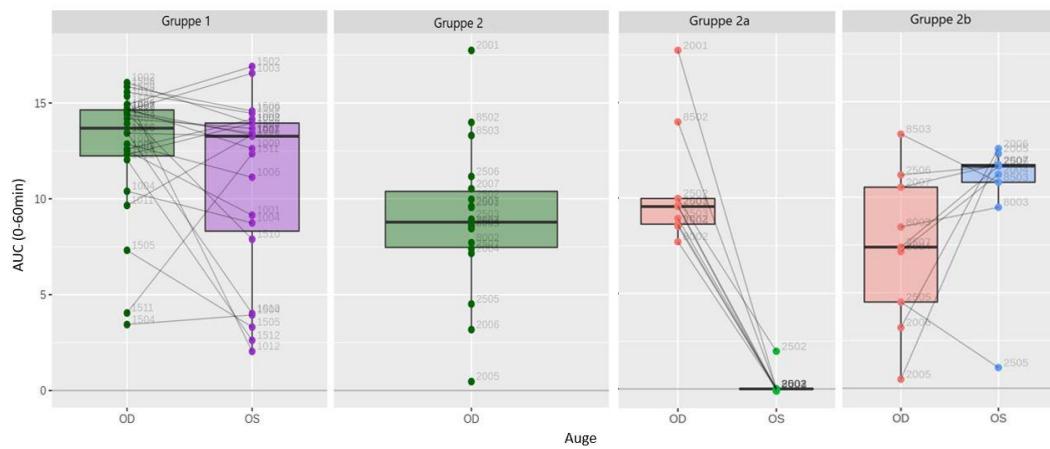


**Abbildung 27:** Zwischenzeitliche Rückentwicklung der Katarakt, A=Messung zu Beginn der Anästhesie, B=Messung im Verlauf der Anästhesie C=Messung

gegen Ende der Anästhesie; grüne Pfeilspitze= Artefakt, Gelber Pfeil= SHB, Blauer Pfeil IRB

Die durchschnittliche maximal erreichte SHB in Gruppe 1 übertraf mit 0.39mm jene der Gruppe 2 (OD) mit 0.32mm. Gruppe 2a (OS) zeigte einen maximalen Wert von 0.04mm, Gruppe 2a (OD) von 0.35mm. In Gruppe 2b erreichten beide Augen ein Maximum von 0.29mm.

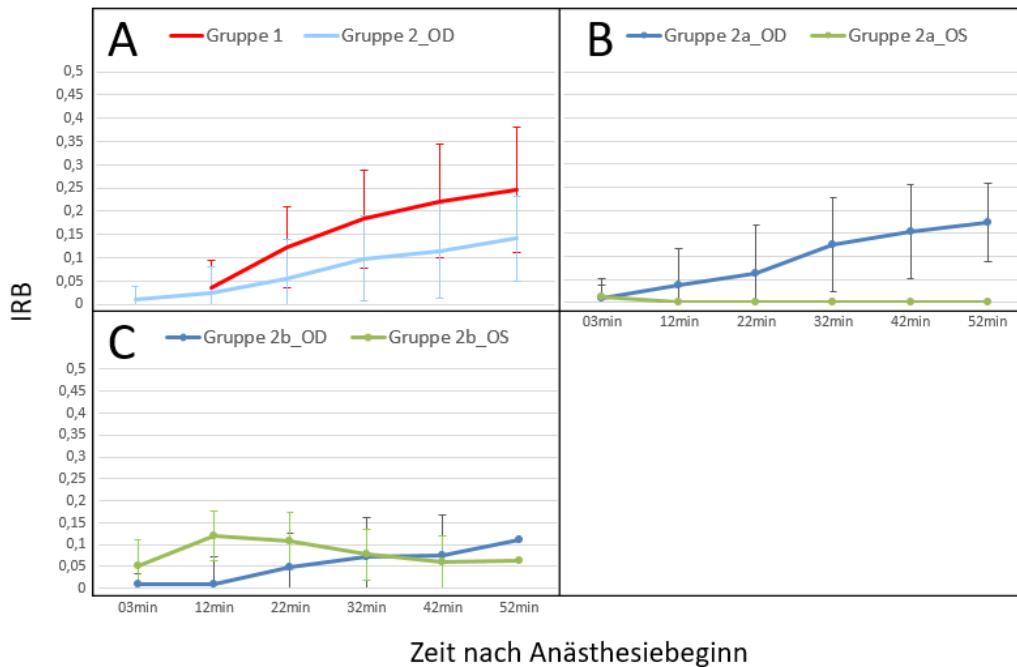
Die AUC-Mittelwerte waren mit 11.76 in Gruppe 1 höher als in Gruppe 2 (OD) mit 8.93. In Gruppe 2a (OS) lag der Wert bei 0.21, in Gruppe 2a (OD) bei 10.52 und in Gruppe 2b (OS) bei 10.26, in Gruppe 2b (OD) bei 7.35. Die Verhältnisse der AUC-Werte sind vergleichend in Abbildung 28 dargestellt.



**Abbildung 28: Box-Plot-Darstellung AUC-Werte SHB**

#### Irisgleich reflektive Bereiche (= IRB):

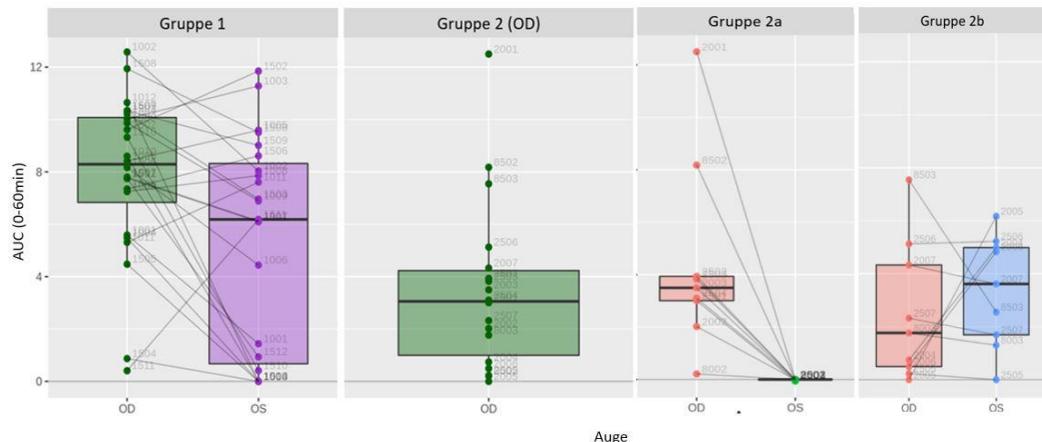
Die Ausmessung der IRB liess gegenüber der SHB in allen Gruppen geringere absolute Werte, jedoch keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Gruppenverhältnisse bei Betrachtung des Verlaufes erkennen (Abbildung 29). Daher wird bezüglich des Verlaufes auf die Beschreibung bei Auswertung der SHB verwiesen.



**Abbildung 29: Mittelwerte und Standardabweichung IRB während der Anästhesie; A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

Die maximal erreichte IRB in Gruppe 1 übertraf mit 0.26mm jene der Gruppe 2 (OD) mit 0.16mm. In Gruppe 2a (OS) lag diese bei 0.01mm, in Gruppe 2a (OD) bei 0.19mm. Gruppe 2b zeigte in beiden Augen eine durchschnittliche IRB von 0.13mm.

Die AUC-Werte der IRB sind in Abbildung 30 in einer Box-Plot Darstellung graphisch veranschaulicht. Quantitativ verdeutlichen die AUC-Mittelwerte die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen: Der Mittelwert von 6.68 der Gruppe 1 war gegenüber Gruppe 2 (OD) mit 3.49 vergleichsweise höher. Gruppe 2a (OS) erreichte einen Wert von 0, Gruppe 2a (OD) 4.47. In Gruppe 2b (OS) war ein Wert von 3.37 festzustellen, in Gruppe 2b (OD) ein Wert von 2.5.

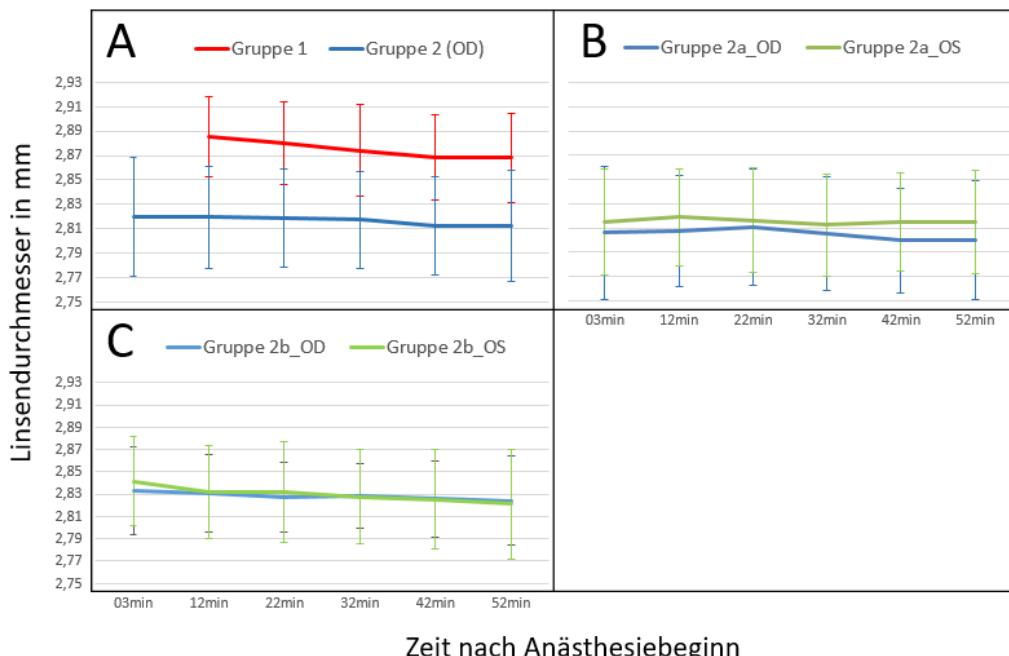


**Abbildung 30: Box-Plot-Darstellung AUC-Werte IRB**

#### 4.3.1.2. Linsendurchmesser

Der durchschnittliche Linsendurchmesser lag in Gruppe 1 bei 2,88mm, in Gruppe 2 (OD) bei 2.81mm, in Gruppe 2a (OD) bei 2.8mm und in Gruppe 2a (OS) bei 2.82mm. In Gruppe 2b wurde in beiden Augen ein Wert von 2.83mm gemessen.

Im Laufe der Anästhesie konnte in allen Gruppen ein abnehmender Trend des Linsendurchmessers beobachtet werden (Abbildung 31): Gruppe 1 zeigte einen negativen Trendwert von -0.00046, Gruppe 2 (OD) von -0.00017. In Gruppe 2b (OS) betrug der Wert -0.00039, in Gruppe 2b (OD) -0.00017. Die linken Linsen der Gruppe 2a nahmen mit -0.00005 am wenigsten ab, was sich auch im Vergleich mit den rechten Augen derselben Gruppe mit -0.00017 bemerkbar machte.



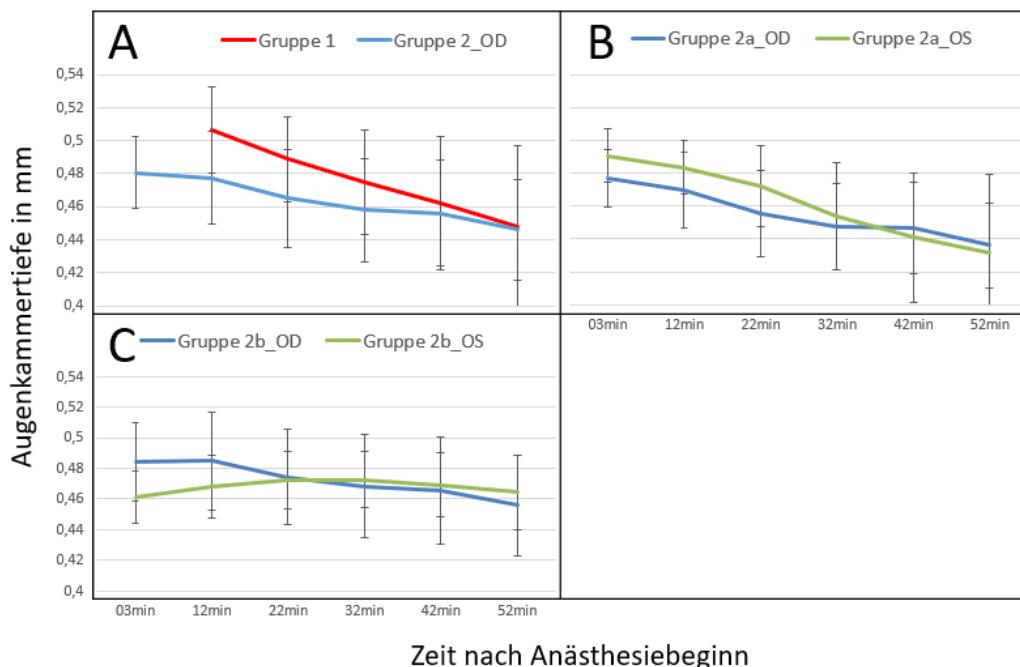
**Abbildung 31: Mittelwert und Standardabweichung Linsendurchmesser während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden:**

**Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

#### 4.3.1.3. Augenkammertiefe

Die durchschnittliche Tiefe der Augenkammer der Gruppe 1 betrug 0.48mm, der Gruppe 2 (OD) 0.46mm, der Gruppe 2a (OS) 0.46mm, Gruppe 2a (OD) 0.45mm und in Gruppe 2b jeweils 0.47mm.

Im Verlauf der Anästhesie war eine abnehmende Tendenz der Augenkammertiefe zu beobachten, mit Ausnahme der linken Augen der Gruppe 2b in welcher die Augenkammertiefe bei einem nahezu konstanten Wert blieb (Abbildung 32). Die Abnahme der Augenkammertiefe hatte in Gruppe 1 einen Trendwert von -0.0014, in Gruppe 2 (OD) von -0.0007, in Gruppe 2a (OS) von -0.0012, in Gruppe 2a (OD) von -0.0007, in Gruppe 2b (OS) -0,00002 und in Gruppe 2b (OD) -0.0007.



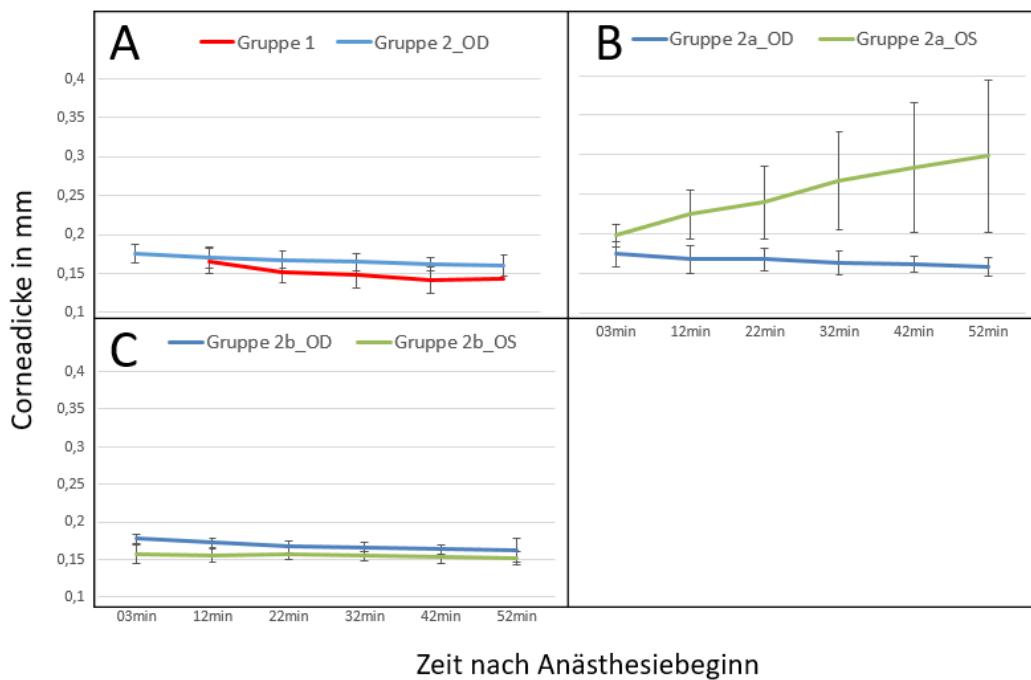
**Abbildung 32: Mittelwerte Augenkammertiefe mit Standardabweichung, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

#### 4.3.1.4. Corneadicke

Die Cornea der Gruppe 1 war durchschnittlich 0.15mm dick, die der Gruppe 2 (OD)

0.17mm. In Gruppe 2b wurden 0.15mm (OS) und 0.17mm (OD) gemessen. In Gruppe 2a (OS) lag mit durchschnittlich 0.25mm eine auffallend dicke Cornea vor, wohingegen jene der rechten Linsen lediglich 0.16mm dick war.

Mit Ausnahme der linken Augen der Gruppe 2a war eine Abnahme der Corneadicke im Verlauf der Anästhesie in allen Gruppen des ersten Versuchsteils zu beobachten. Gruppenspezifische Unterschiede können anhand der Abbildung 33 und der Trendwerte der Corneadicke über die gesamte Dauer der Anästhesie hinweg verdeutlicht werden: Gruppe 1 zeigte mit -0.00056 eine grössere Abnahme der Corneadicke als Gruppe 2 (OD) mit -0.0003. Für Gruppe 2a (OS) ergab sich aufgrund des Anstiegs der Corneadichte ein positiver Trendwert von 0.00205, was einem Wert von -0.0003 der Gruppe 2a (OD) entgegensteht. Die Abnahme der Gruppe 2b (OS) war mit -0.0001 geringer als die Gruppe 2b (OD) mit -0.0003.



**Abbildung 33: Mittelwerte und Standardabweichungen der Corneadicke während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)**

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass in nahezu allen Augen der Gruppe 2a (OS) im Laufe der Anästhesie eine gräulich-weissliche Veränderung der Cornea zu vermerken war.

**4.3.1.5. Verteilung der Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche**

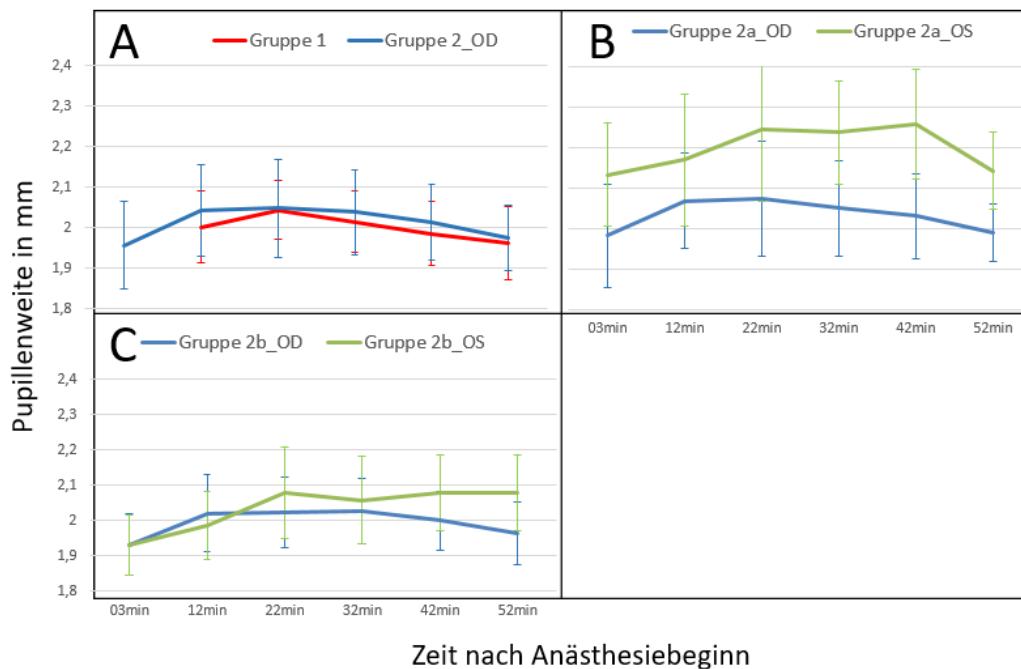
Die Verteilung der Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche lag nach Umwandlung der Befunde in eine numerische Skala in Gruppe 1 bei einem durchschnittlichen Wert von 0.93, in Gruppe 2 (OD) bei 1.82. Innerhalb der Gruppen 2a und 2b ergaben sich nur geringfügige Unterschiede mit Werten von 1.89 (Gruppe 2a OS) beziehungsweise 1.82 (Gruppe 2a OD) und 1.72 (Gruppe 2b OS) beziehungsweise 1.83 (Gruppe 2b OD). Gruppe 1 stach somit durch einen mit Abstand geringsten Wert hervor.

In Gruppe 1 konnte während der Versuchsdurchführung ein wiederholtes Abfliessen der applizierten Natriumchloridlösung bemerkt werden, was in Gruppe 2 weniger häufig der Fall war.

**4.3.1.6. Mydriasis**

Die durchschnittliche Pupillenweite der Gruppe 1 betrug 2mm, jene der Gruppe 2 (OD) 2.01mm. Die rechten Pupillen der Gruppe 2a waren 2.03mm breit, die linken Pupillen 2.2mm. Die Weite der rechten Pupillen der Gruppe 2b betrug 1.99mm, die der linken 2.03mm.

Abbildung 34 zeigt in Gruppe 1, Gruppe 2 (OD), Gruppe 2a (OD) und 2b (OD)) zu Beginn der Anästhesie bis zum Messzeitpunkt 12 beziehungsweise 22 Minuten eine Zunahme, im Anschluss eine Abnahme der Pupillenweite. Neben höheren Durchschnittswerten zu allen Messzeitpunkten wies Gruppe 2a (OS) vergleichsweise zu Gruppe 2a (OD) einen stärkeren Anstieg zwischen dem zweiten und dritten Messzeitpunkt und einen später beginnenden Rückgang der Pupillenweite auf. Gruppe 2b (OS) stagnierte nach Erreichen der maximalen Pupillenweite beim Messzeitpunkt 22 Minuten auf einem nahezu konstanten Wert und unterschied sich somit von Gruppe 2b (OD), welche einen Rückgang der Mydriasis gegen Ende der Anästhesie beobachten liess.

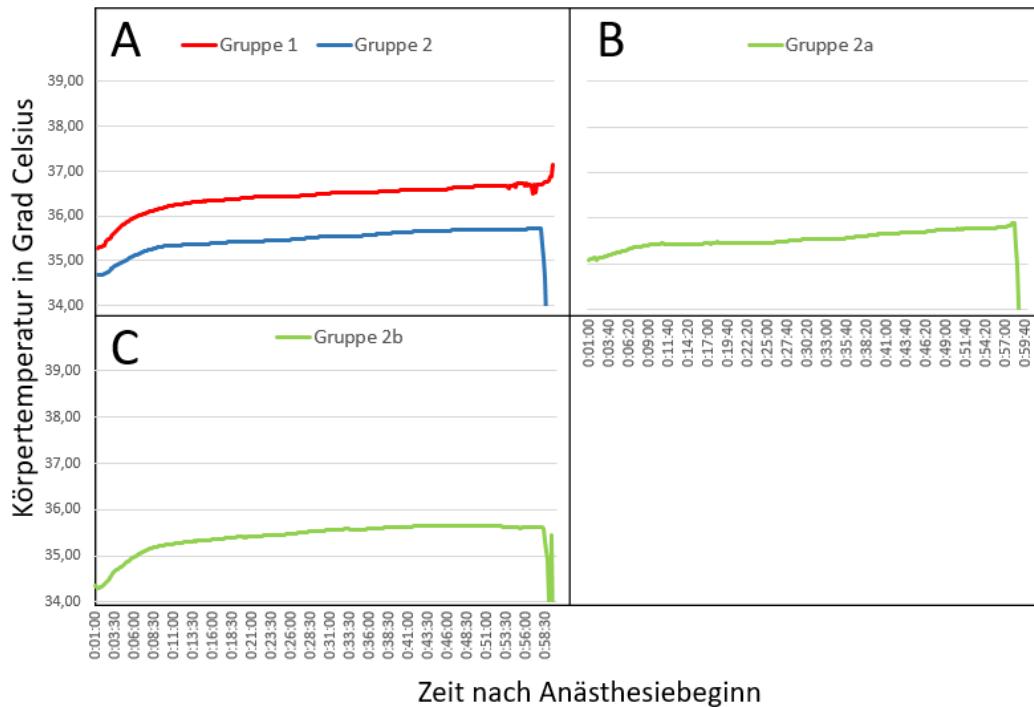


**Abbildung 34:** Mittelwerte und Standardabweichung der Pupillenweite während der Anästhesie, A) Vergleich verschiedener Applikationsmethoden: Gruppe 1 (Feindosierungsspritze) und OD Gruppe 2 (Pipette); B/C) Vergleich verschiedener Substanzen B) Gruppe 2a OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumhyaluronat-Augengel), C) Gruppe 2b OD (Hypromellose- und Natriumchloridlösung) und OS (Natriumchloridlösung)

#### 4.3.1.7. Körpertemperatur

Die durchschnittliche Körpertemperatur der Gruppe 1 betrug 36,41 Grad Celsius, jene der Gruppe 2 35,45 Grad Celsius. Aufgeteilt in die Gruppe 2a und b ergab sich ein Durchschnittswert von 35,51 Grad Celsius in Gruppe 2a, 35,39 Grad Celsius in Gruppe 2b.

Abbildung 35 lässt im Verlauf der Anästhesie einen konstanten Anstieg der Körpertemperatur aller Gruppen in ähnlichem Ausmass erkennen.



**Abbildung 35: Durchschnittlicher Verlauf der Körpertemperatur, A: Gruppe 1 und Gruppe 2, B: Gruppe 2a, C: Gruppe 2b**

#### 4.3.2. Wahl des Corneabefeuchtungsprotokolls für Versuchsteil 2

Bei Verwendung des Protokolls 2 (OD Gruppe 2) wurde eine Kataraktinzidenz von 94.4% und ein konstant progressiver Verlauf aller gemessenen Kataraktparameter vermerkt. In den Gruppen 3-6 des zweiten Versuchsteils konnten mit Anwendung dieses Protokolls potentiell mildernde, aber auch steigernde Einflüsse weiterer Faktoren detektiert werden.

Vom Einsatz des Protokolls 1 (=Gruppe 1) bzw 4 (= OS Gruppe 2b) mit einer schwerwiegenderen/früher progressiver verlaufenden Kataraktformation wurde im zweiten Versuchsteil abgesehen, da die Beeinflussung der Versuchstiere aus Tierschutzgründen möglichst gering gehalten werden sollte und potentiell verstärkende Einflüsse auf die Kataraktformation nach Verwendung dieser Protokolle möglicherweise nicht mit ausreichender statistischer Aussagekraft festgestellt werden könnten. Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse des zweiten Versuchsteils durch die in Gruppe 2a (OS) beobachteten Corneaveränderungen auszuschliessen, wurde Protokoll 3 ebenfalls hintenangestellt.

Die Ergebnisse der Gruppe 2 (OD) dienten folglich im zweiten Versuchsteil zum Vergleich mit den Gruppen 3-6 und wurden als Kontrollgruppe bezeichnet.

### 4.3.3. Versuchsteil 2: Variation weiterer Versuchsbedingungen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Vergleichs der Kontrollgruppe mit den folgenden, in den Gruppen 3-6 veränderten Versuchsbedingungen dargestellt: Mydratikum (Gruppe 3 mit zusätzlicher Atropinapplikation), Anästhesieprotokoll (Gruppe 4 mit Xylazin-Ketamin-Anästhesie), Mausstamm (Gruppe 5 BALB/c) und externe Wärmezufuhr (Gruppe 6 mit zusätzlichem TMS).

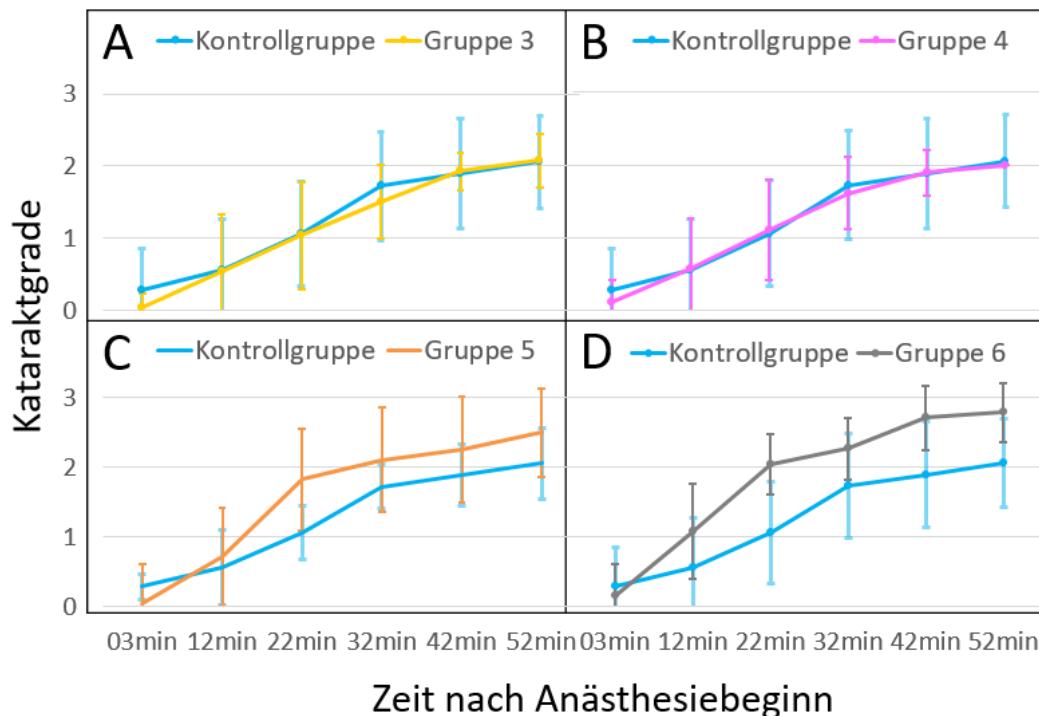
#### 4.3.3.1. Kataraktformation

##### Spaltlampenergebnisse

###### Graduierung Katarakt

Abbildung 36A und B zeigen in ähnlichem Ausmass eine nahezu konstant progressive Zunahme der Grade der Katarakt der Kontrollgruppe und der Gruppen 3 beziehungsweise 4.

In den Gruppen 5 und 6 war verglichen mit der Kontrollgruppe ein schwerwiegenderer Verlauf festzustellen (Abbildung 36 C+D). Die gruppendurchschnittlichen, absoluten Werte der Gruppen 5 und 6 überstiegen jene der Kontrollgruppe bereits nach 12 Minuten bis zum Beenden der Anästhesie, wobei Gruppe 6 die durchschnittlich höchsten Werte erreichte.



**Abbildung 36: Kataraktgrade Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollgruppe und A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

Die im Folgenden aufgeführten, durchschnittlichen Befunde der Gradentwicklung

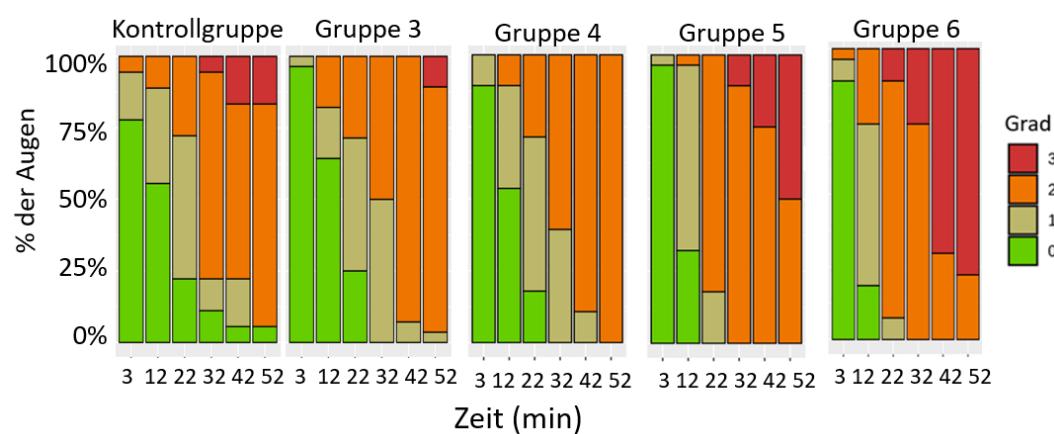
verdeutlichen quantitativ die zuvor beschriebenen Gruppenverhältnisse und können graphisch den Abbildungen 79-82 in Anhang 3 entnommen werden:

Der maximal erreichte Grad betrug in der Kontrollgruppe 2.06, in Gruppe 3 2.07 und in Gruppe 4 2.0. Die Gruppen 5 und 6 zeigten mit 2.5 und 2.78 im Vergleich mit der Kontrollgruppe höhere Werte.

Grad 2 und höher wurde durchschnittlich 2.86mal in Gruppe 3 und 2.89mal in Gruppe 4 erreicht, nahezu gleich oft wie in der Kontrollgruppe mit 2.94mal. In den Gruppen 5 und 6 hingegen wurde dies mit 3.86mal (Gruppe 5) und 4.2mal (Gruppe 6) häufiger als in der Kontrollgruppe beobachtet. Grad 3 wurde in Gruppe 3 durchschnittlich 0.11mal beobachtet, in der Kontrollgruppe 0.39mal. In Gruppe 4 wurde Grad 3 nicht erreicht. Gruppe 5 erreichte Grad 3 mit 0.86mal, Gruppe 6 mit 1.84mal häufiger als die Kontrollgruppe.

Grad 2 und höher trat in Gruppe 3 nach 31.9 Minuten, in Gruppe 4 nach 33.07 Minuten und in der Kontrollgruppe nach 30.88 Minuten auf. Gruppe 5 hingegen erreichte Grad 2 und höher bereits nach 23.43 Minuten, Gruppe 6 nach 19.81 Minuten. In Gruppe 5 wurde Grad 3 nach durchschnittlich 44.64 Minuten, in der Kontrollgruppe nach 38.67 Minuten erreicht. Gruppe 6 unterschied sich mit 38.19 Minuten nicht wesentlich von der Kontrollgruppe. In Gruppe 4 wurde Grad 3 nicht erreicht, in Gruppe 3 liess sich aufgrund der kleinen Datenmengen keine Auswertung mit ausreichender Sicherheit durchführen.

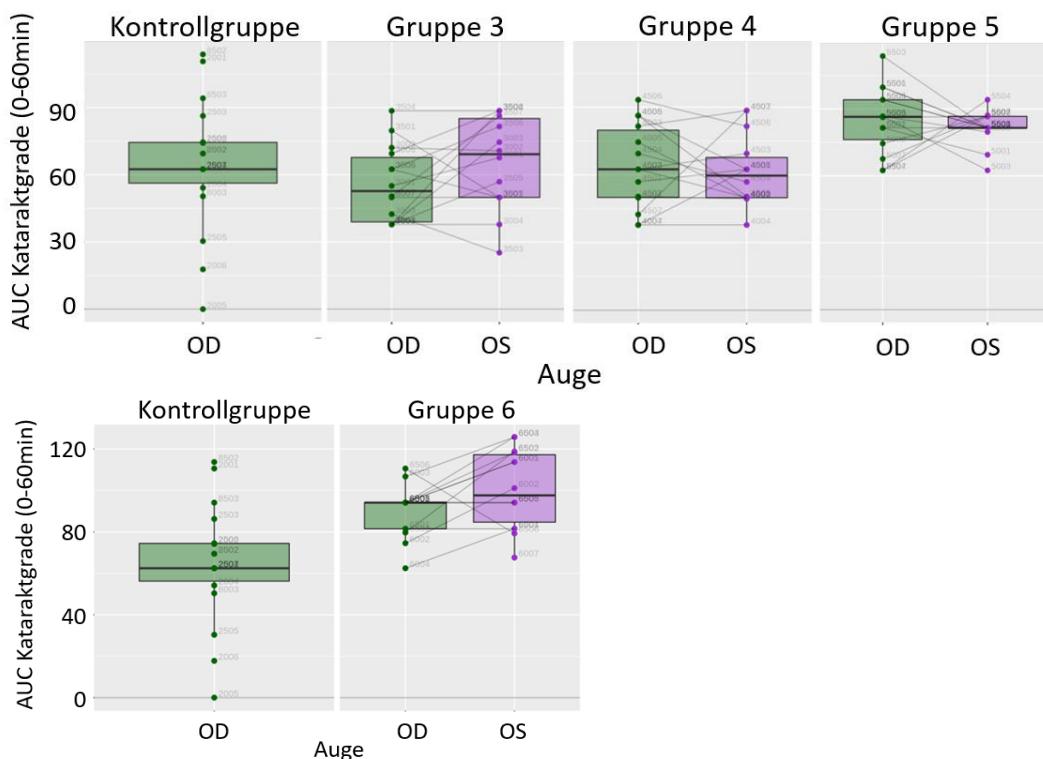
Abbildung 37 zeigt die Gradverteilung zu den einzelnen Messzeitpunkten. Eine Zunahme der Gradanteile im Verlauf der Anästhesie in Richtung schwerwiegenderer Kataraktgrade wird bei allen Gruppen, jedoch vor allem bei den Gruppen 5 und 6 deutlich.



**Abbildung 37: Gradverteilung innerhalb der Gruppen des zweiten**

### Versuchsteils über den gesamten Verlauf der Anästhesie

Die AUC-Werte der Gruppen 3 und 4 zeigten keine nennenswerten Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 38). Konkret äusserte sich dies durch die Mittelwerte 60.68 in Gruppe 3, 62.51 in Gruppe 4 und 64.29 in der Kontrollgruppe. Deutlich höher als in der Kontrollgruppe waren die Werte der Gruppe 5 mit 83.33 und Gruppe 6 mit 95.33.

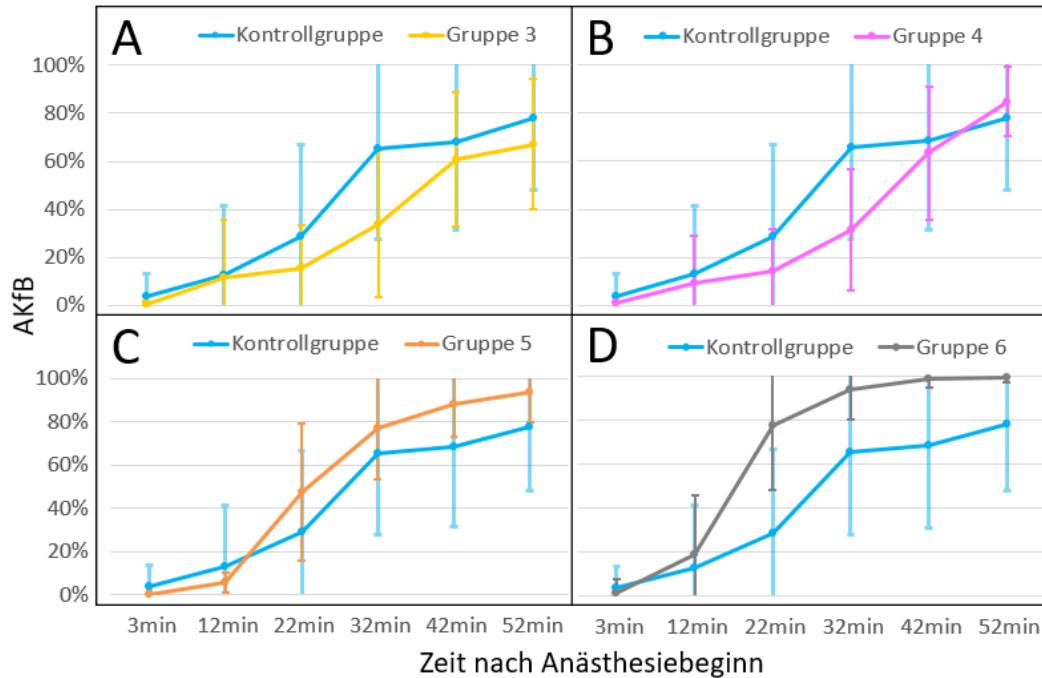


**Abbildung 38: Boxplot-Darstellung der AUC-Werte der Gradverteilung der Gruppen des zweiten Versuchsteils**

### Ausdehnung der Katarakt bei frontaler Betrachtung (= AKfB):

Die AKfB der Kontrollgruppe verlief - mit Ausnahme einer sprunghaften Zunahme zwischen den Messzeitpunkten 22 und 32 Minuten - konstant zunehmend von circa 0 bis knapp 80% (siehe Abbildung 39). Vergleichsweise erfolgte in den Gruppen 3 und 4 zwischen 12 und 32 Minuten eine geringere, nach 32 Minuten eine stärkere Zunahme. Gruppe 3 erreichte beim Beenden der Anästhesie geringfügig geringere, Gruppe 4 höhere prozentuale Werte verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 39 A und B). Gruppe 5 zeigte verglichen mit der Kontrollgruppe zwischen 12 und 22 Minuten eine stärkere Zunahme der AKfB (Abbildung 39C). Ab dem Zeitpunkt  $t = 22$  Minuten waren die prozentualen Werte der AKfB in Gruppe 5 höher als in der Kontrollgruppe, die relative Zunahme zeigte jedoch keine nennenswerten Unterschiede. Gruppe 6 unterschied sich am deutlichsten von der Kontrollgruppe

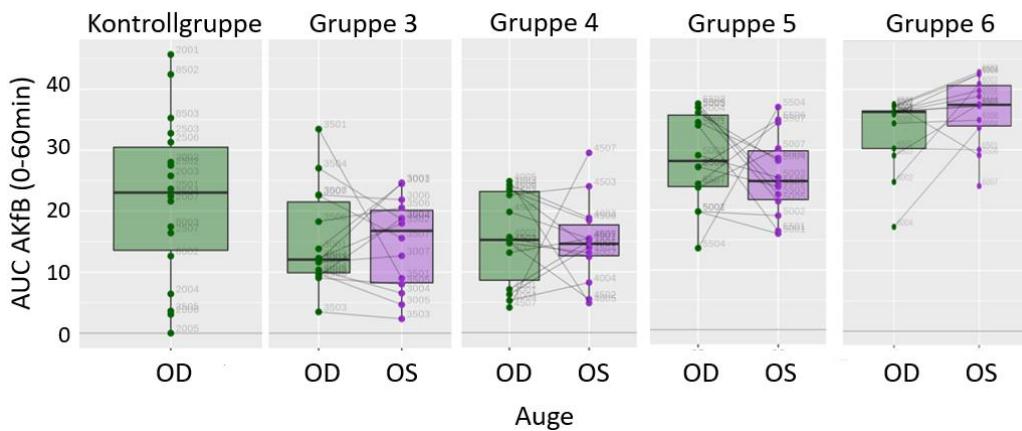
anhand einer progressiveren Zunahme der AKfB zwischen 12 und 22 Minuten und einer grösseren Ausdehnung ab t= 12 Minuten (Abbildung 39D).



**Abbildung 39: Mittelwerte und Standardabweichung der AKfB der Kontrollgruppe im Vergleich mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

Die durchschnittlich maximale AKfB war in Gruppe 3 bei 73%, in der Kontrollgruppe bei 83% und Gruppe 4 bei 85%. Gruppe 5 und 6 erreichten mit einer 96%igen beziehungsweise 100%igen AKfB höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe.

Abbildung 40 zeigt eine graphische Darstellung der AUC-Werte der AKfB der jeweiligen Gruppen. Die folgenden Mittelwerte verdeutlicht die Unterschiede zwischen den Gruppen: Der AUC-Mittelwert war in Gruppe 3 mit 15.05 und in Gruppe 4 mit 15.34 geringer als in der Kontrollgruppe mit 22, die Gruppen 5 mit 27.32 und 6 mit 34.54 höher.

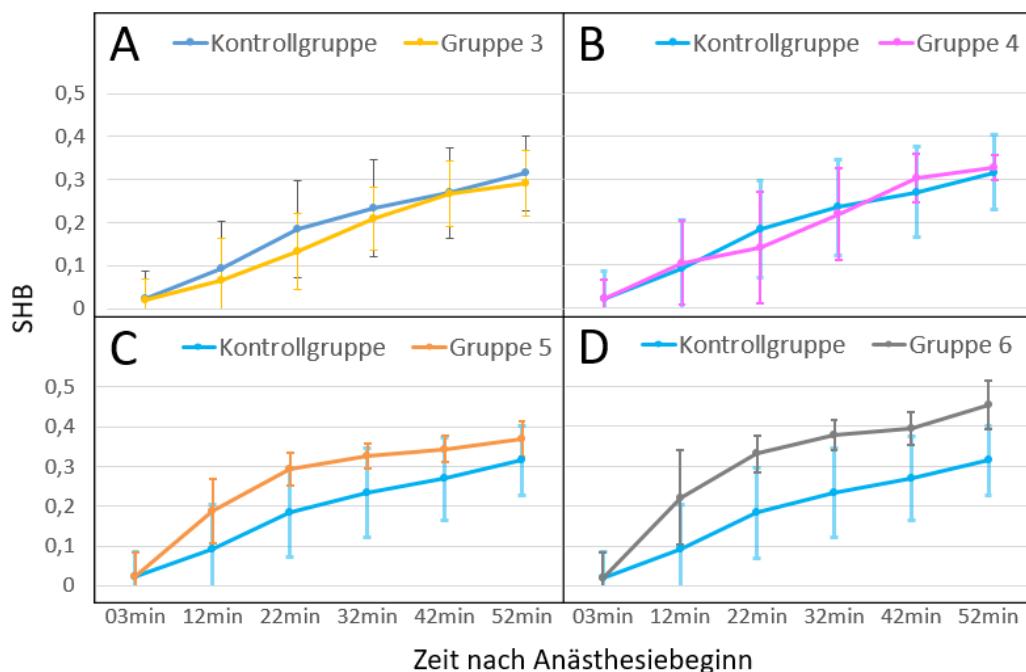


**Abbildung 40:** Boxplot-Darstellung der AUC-Werte AKfB der Gruppen des zweiten Versuchsteils

### OCT-Ergebnisse

#### Sämtliche hyperreflektive Bereiche (= SHB)

Die Gruppen 3 und 4 zeigten einen relativ konstant progressiven Anstieg der SHB, welcher bei Betrachtung über die gesamte Anästhesiedauer keine nennenswerte Unterschiede zur Kontrollgruppe vorwies (Abbildung 41 A und B). Lediglich zum Zeitpunkt 22 Minuten waren kleinere absolute Werte der Gruppen 3 und 4 verglichen mit der Kontrollgruppe zu bemerken. Die Gruppen 5 und 6 zeigten verglichen mit der Kontrollgruppe zu Beginn der Anästhesie einen progressiveren Verlauf und erreichten folglich höhere absolute Werte (Abbildung 41C und D).

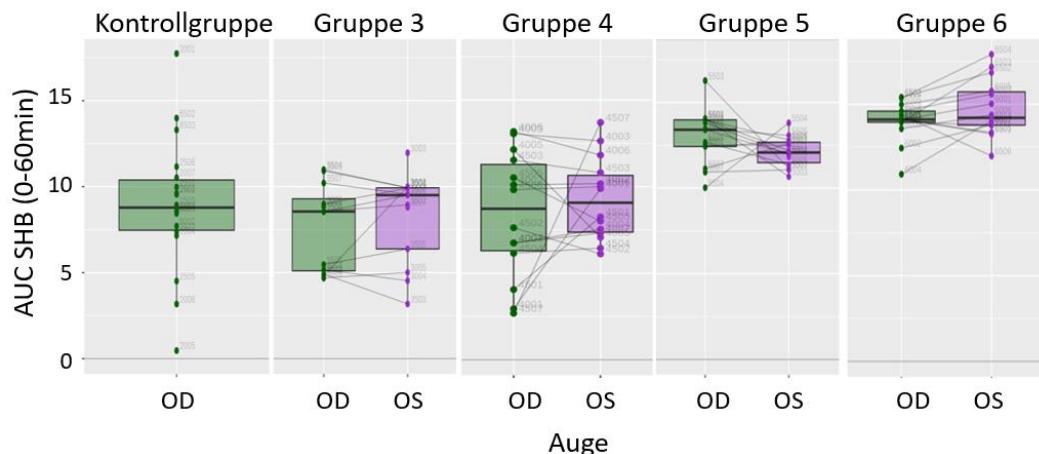


**Abbildung 41:** Mittelwert und Standardabweichung SHB der Kontrollgruppe im Vergleich mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6

Die durchschnittlich maximal erreichte SHB von 0.30mm in Gruppe 3 und 0.33mm

in Gruppe 4 war nahezu identisch mit jener der Kontrollgruppe (= 0.32mm). Gruppe 5 erreichte 0.37mm, Gruppe 6 erzielte den höchsten Messwert mit 0.45mm.

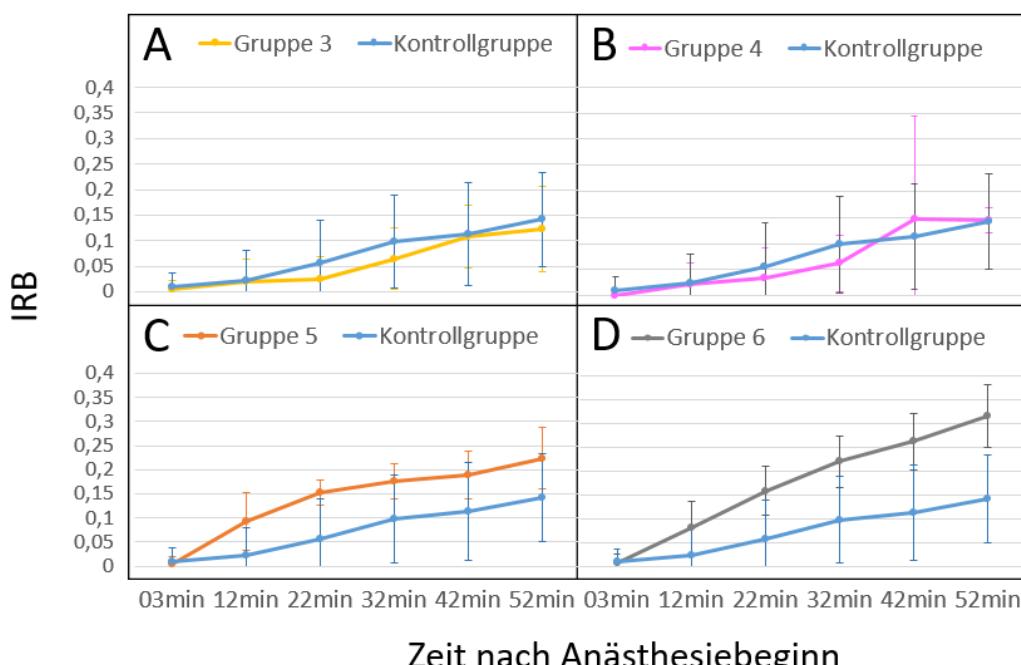
Der AUC-Mittelwert der SHB war mit 8.1 in Gruppe und 8.82 in Gruppe 4 ähnlich zur Kontrollgruppe mit 8.93. Die Gruppen 5 und 6 erreichten mit 12.52 und 14.38 höhere Werte. Die Verhältnisse der AUC-Werte zwischen den einzelnen Gruppen sind in Abbildung 42 graphisch dargestellt.



**Abbildung 42: Boxplot-Darstellung der AUC-Werte der SHB der jeweiligen Gruppen**

#### Irisgleich reflektive Bereiche (= IRB)

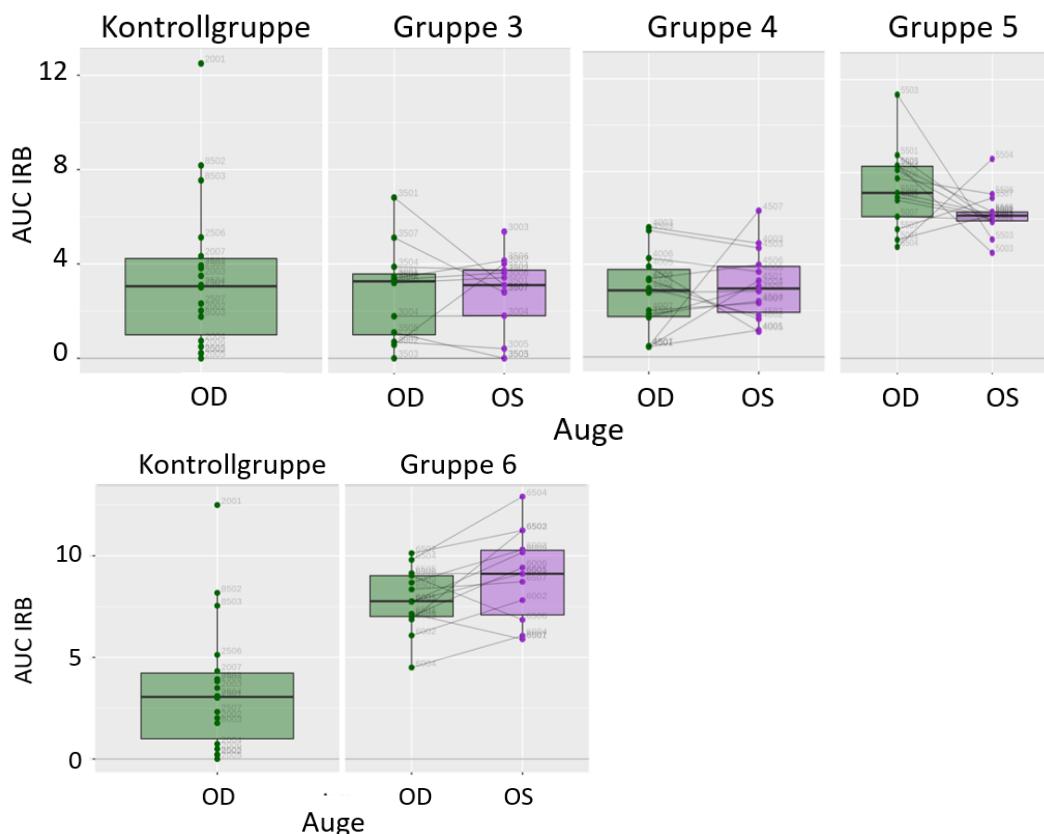
Die IRB zeigte gegenüber der SHB geringere absolute Werte, der relative Verlauf sowie die gruppenvergleichenden Verhältnisse entsprach jedoch im wesentlichen dem der SHB (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Mittelwert und Standardabweichung IRB der Kontrollgruppe und A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

Die durchschnittliche maximale IRB der Gruppe 3 mit 0.13mm und Gruppe 4 mit 0.15mm ähnelte der Kontrollgruppe mit 0.16mm. Gruppe 5 erreichte 0.22mm, Gruppe 6 den höchsten Messwert mit 0.32mm.

Der AUC-Mittelwert der Gruppe 3 war mit 2.84 wie jener der Gruppe 4 mit 2.92 geringer als jener der Kontrollgruppe mit 3.49. Die Gruppen 5 und 6 zeigten höhere Werte mit 6.74 und 8.35. Abbildung 44 veranschaulicht die Unterschiede des Gruppenvergleichs in Form einer Boxplot-Darstellung.



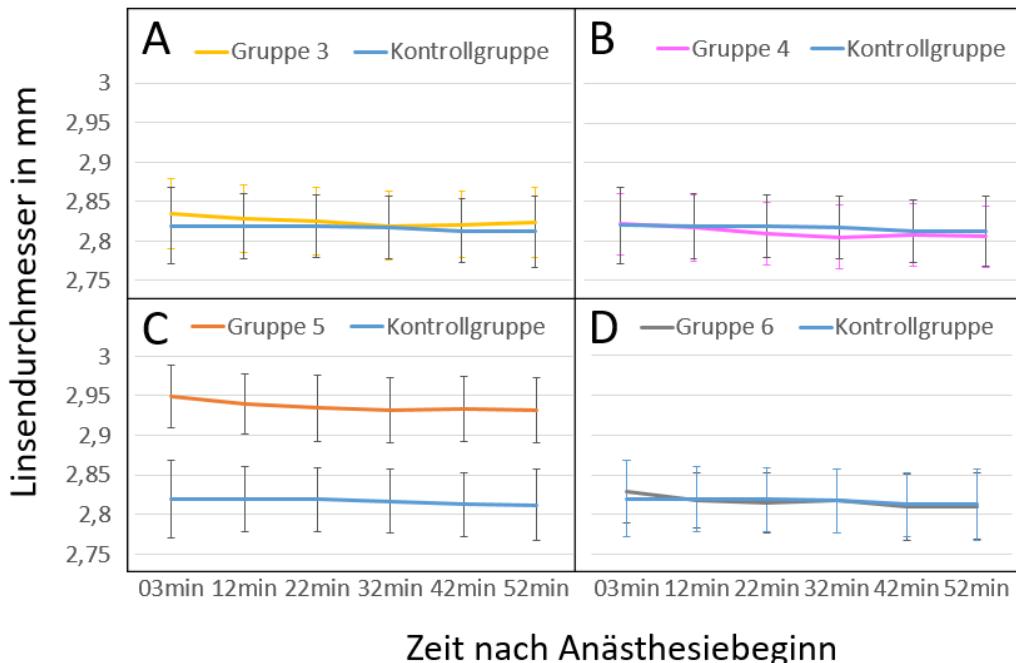
**Abbildung 44: Boxplot-Darstellung der AUC-Werte der IRB der Gruppen des zweiten Versuchsteils**

#### 4.3.3.2. Linsendurchmesser

Der durchschnittliche Linsendurchmesser der Kontrollgruppe und Gruppe 6 betrug 2.82mm. Gruppe 3 und 4 zeigten mit 2.83mm beziehungsweise 2.81mm ähnliche Werte. Die Linsen der Gruppe 5 hingegen waren mit durchschnittlich 2.94mm merklich grösser.

In den Linsen aller Gruppen konnte ein abnehmender Trend des Linsendurchmessers im Verlauf der Anästhesie beobachtet werden (Abbildung 45).

Dieser war in der Kontrollgruppe mit einem negativen Wert von -0.00017 geringer als in Gruppe 3 mit -0.00024, Gruppe 5 mit -0.00029 und Gruppe 4 und 6 mit -0.00031.

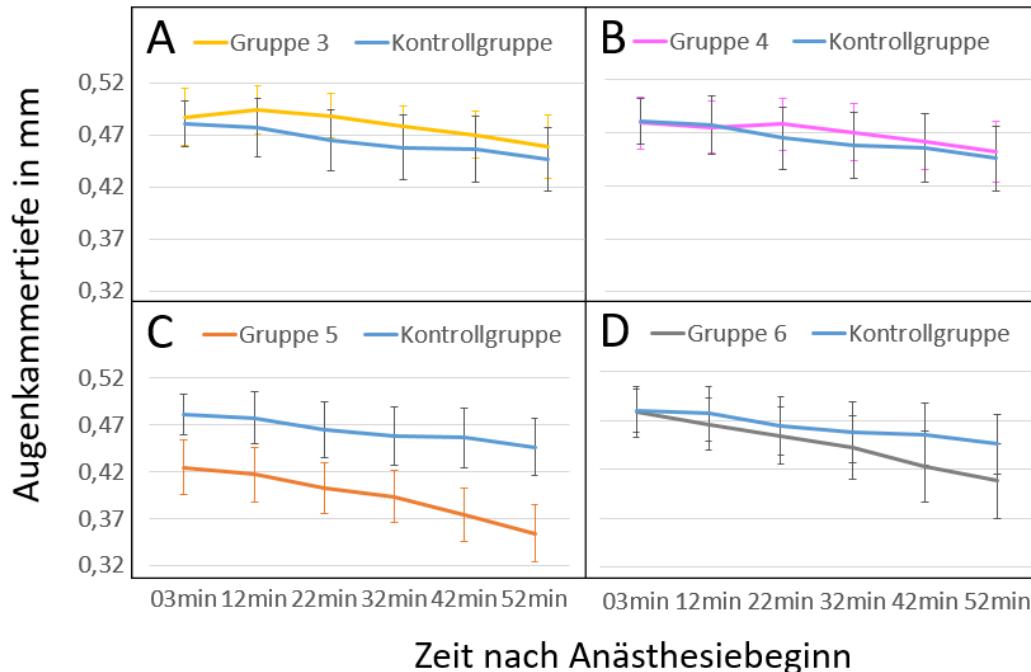


**Abbildung 45:** Mittelwerte und Standardabweichung des Linsendurchmessers der Kontrollgruppe während der Anästhesie, Verglichen mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6

#### 4.3.3.3. Augenkammertiefe

Die durchschnittliche Tiefe der Augenkammer betrug in der Kontrollgruppe 0,46mm. Ähnliche Werte wurden in Gruppe 6 mit 0.45mm, Gruppe 4 mit 0.47mm und Gruppe 3 mit 0.48mm ausgemessen. Gruppe 5 hatte mit durchschnittlich 0.39mm eine merklich flachere Augenkammer.

Im Verlauf der Anästhesie war eine Abnahme der Augenkammertiefe aller Gruppen zu beobachten (Abbildung 46). Der negative Trendwert der Gruppen 3 und 4 zeigte mit -0.0006 und -0.0005 geringe Unterschiede zur Kontrollgruppe mit -0.0007. Die Gruppen 5 und 6 zeigten vergleichsweise mit einem Trendwert von jeweils -0.0014 eine grössere Abnahme.

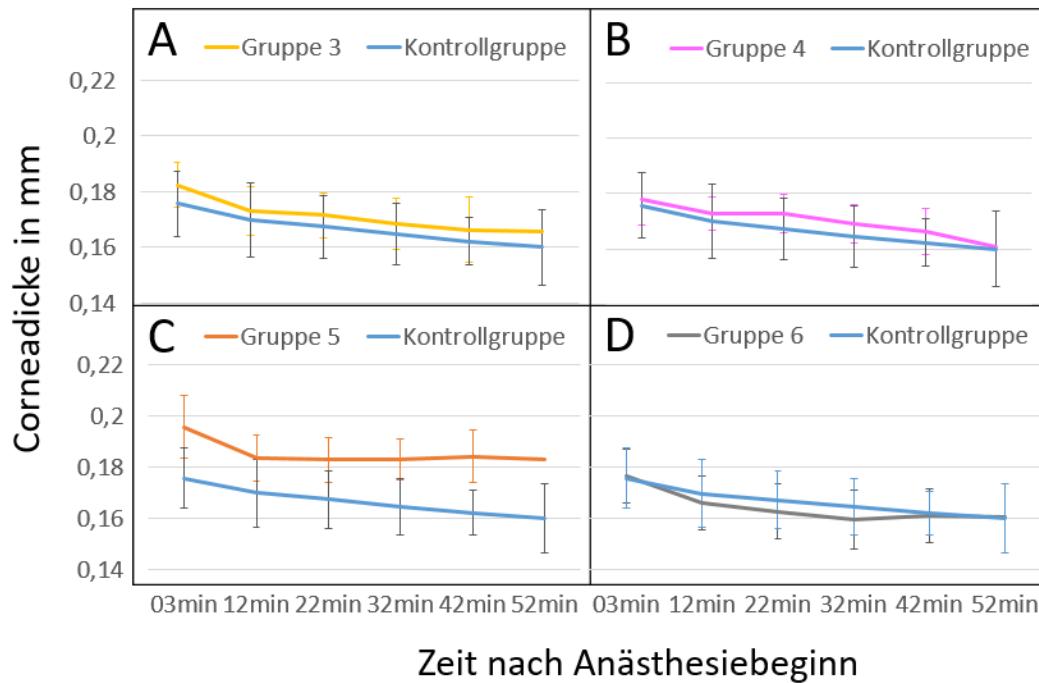


**Abbildung 46: Mittelwerte und Standardabweichung der Augenkammertiefe der Kontrollgruppe während der Anästhesie, Verglichen mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

#### 4.3.3.4. Corneadicke

Die durchschnittliche Dicke der Cornea betrug in den Gruppen 3, 4 und der Kontrollgruppe 0.17mm, in Gruppe 5 0.18mm und in Gruppe 6 0.16mm.

Mit fortschreitender Anästhesiedauer nahm die Corneadicke in allen Gruppen des zweiten Versuchsteils ab. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten anhand des Trendwertes deutlich gemacht werden: In den Gruppen 3 und 4 resultierte jeweils ein Wert von -0,00031, in der Kontrollgruppe -0,00030 (Abbildung 47). Auch in Gruppe 6 war mit einem Wert von -0,00028 kein eindeutiger Unterschied festzustellen. Jedoch fällt bei Betrachtung des Verlaufes in Abbildung 47 eine zu Beginn stärkere Abnahme und gegen Ende der Anästhesie eine Stagnation der Corneadicke auf, verglichen mit einer konstant abnehmenden Tendenz der Kontrollgruppe. Die Abnahme der Corneadicke der Gruppe 5 stagnierte ebenfalls bereits nach 12 Minuten auf einem relativ konstanten Wert und der negative Trendwert dieser Gruppe lag bei -0,00017.



**Abbildung 47: Mittelwerte und Standardabweichung der Corneadicke der Kontrollgruppe während der Anästhesie, Verglichen mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

#### 4.3.3.5. Verteilung Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche

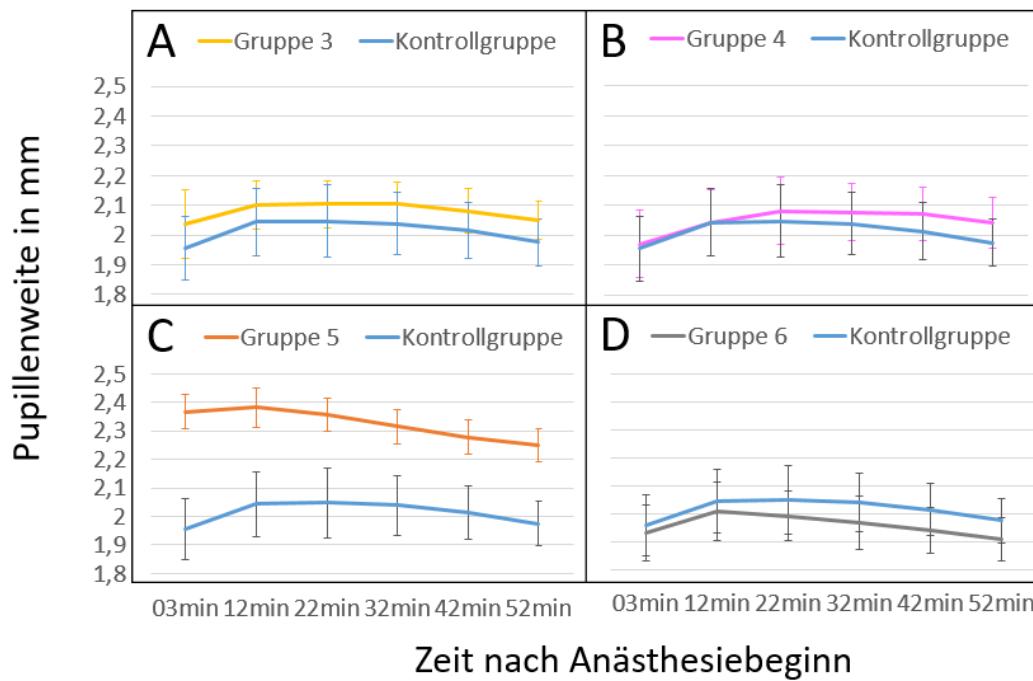
Die Auswertung der mit Flüssigkeit bedeckten Anteile der Corneaoberfläche in eine numerische Skala ergab für Gruppe 3 mit 1.67, Gruppe 4 mit 1.73 und Gruppe 6 mit 1.63 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1.82 geringfügig geringere Werte. Auffallend war Gruppe 5, welche mit einem Wert von 1.31 deutlich abwich.

Während der praktischen Versuchsdurchführung entstand der Eindruck einer vergleichsweise schnelleren Größenabnahme der Tropfen in Gruppe 6 verglichen mit den restlichen Gruppen 1-5. Ein vermehrtes Abfliessen der applizierten Flüssigkeiten wie in Gruppe 1 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

#### 4.3.3.6. Mydriasis

Die durchschnittliche Pupillenweite der Kontrollgruppe betrug 2.01mm, der Gruppe 6 1.95mm, Gruppe 4 2.05mm und Gruppe 3 2.08mm. Gruppe 5 zeigte mit durchschnittlich 2.32mm einen deutlich höheren Wert.

Mit Ausnahme der Gruppe 5 war in allen Gruppen zu Beginn der Anästhesie eine deutliche Zunahme, gegen Ende eine Abnahme der Pupillenweite zu beobachten (Abbildung 48). In Gruppe 5 lies sich zu Beginn der Anästhesie keine eindeutige Zunahme und im Verlauf der Anästhesie eine vermehrte Abnahme der Pupillenweite bemerken.

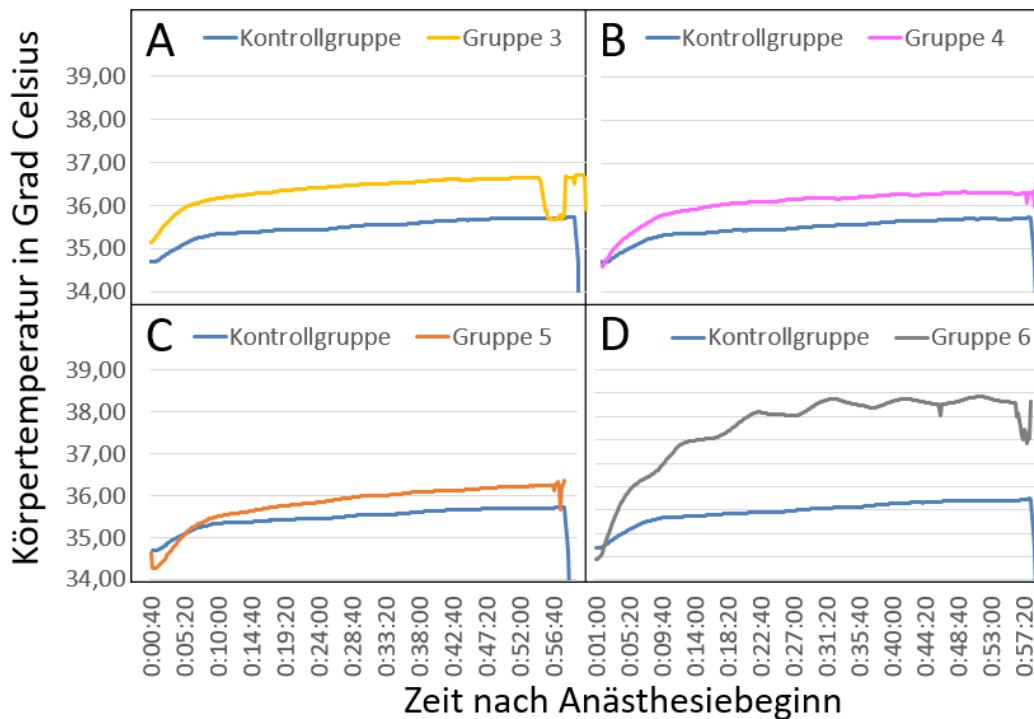


**Abbildung 48: Mittelwerte und Standardabweichung der Pupillenweite der Kontrollgruppe während der Anästhesie, Verglichen mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6**

#### 4.3.3.7. Körpertemperatur

Die durchschnittliche Körpertemperatur der Kontrollgruppe lag bei 35.48 Grad Celsius, jene der Gruppen 5 bei 35.81 Grad Celsius, Gruppe 4 bei 36.03 Grad Celsius und Gruppe 3 bei 36.35 Grad Celsius. Gruppe 6 sticht durch eine deutlich höhere Durchschnittstemperatur von 37.27 Grad Celsius hervor.

Nach Beginn der externen Wärmezufuhr war ein Anstieg der Körpertemperatur in allen Gruppen zu beobachten (Abbildung 49). Dieser näherte sich in der Kontrollgruppe und den Gruppen 3, 4 und 5 nach 10 Minuten einem nahezu konstant stagnierendem Wert, welcher circa ein bis eineinhalb Grad Celsius höher war als der Ausgangswert. Abweichend davon war in Gruppe 6 über den gesamten Anästhesieverlauf hinweg ein Anstieg der Körpertemperatur auf nahezu maximal 38 Grad Celsius zu beobachten. Des Weiteren waren einzig in Gruppe 6 vermehrte Schwankungen während der Zunahme der Körpertemperatur auffallend.



**Abbildung 49:** Verlauf der durchschnittlichen Körpertemperatur der Kontrollgruppe während der Anästhesie im Vergleich mit A) Gruppe 3, B) Gruppe 4, C) Gruppe 5, D) Gruppe 6

#### 4.3.4. Einfluss des Geschlechtes

Für die Untersuchung eines möglichen Geschlechtereinflusses wurden die Versuchstiere nach Geschlecht separiert und die Differenz der Mittelwerte der jeweiligen AUC-Parameter verglichen (siehe Tabelle 25 Anhang 4). Die AUC-Mittelwerte der Katarkatgrade beider Geschlechter unterschieden sich maximal um eine Differenz von 8.61 (Gruppe 1), jene der AKfB maximal um 3.61 (ebenfalls Gruppe 1), die AUC-Werte der SHB maximal um 1.12 (Gruppe 4) und jene der IRB um maximal 1.31 (Gruppe 6).

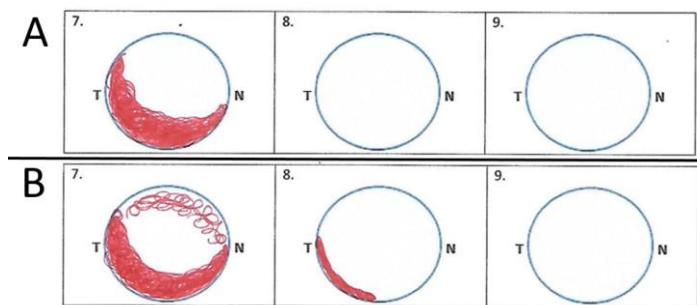
#### 4.3.5. Unterschiede der Katarakt nach Beenden der Anästhesie

##### 4.3.5.1. Kataraktrückentwicklung

Für die Beurteilung der Kataraktentwicklung nach Beenden der Anästhesie konnten lediglich die Spaltlampenbefunde der Kataraktgraduierung der Gruppen 2-6 herangezogen werden: Gruppe 1 wurde unmittelbar im Anschluss der Anästhesie euthanasiert um eine histologische Untersuchung der getrübten Linsen durchzuführen. Eine detaillierte Spaltlampenuntersuchung zur Bestimmung der AKfB, sowie die Aufnahme von OCT-Scans zur Ausmessung der SHB/IRB war aufgrund von Abwehrbewegungen der wachen Tiere der Gruppen 2-6 nicht

durchführbar.

Die Geschwindigkeit und die Dauer der Rückentwicklung der Katarakt variierte zwischen den verschiedenen Gruppen. Ein solch unterschiedlicher Verlauf ist in Abbildung 50 exemplarisch dargestellt.



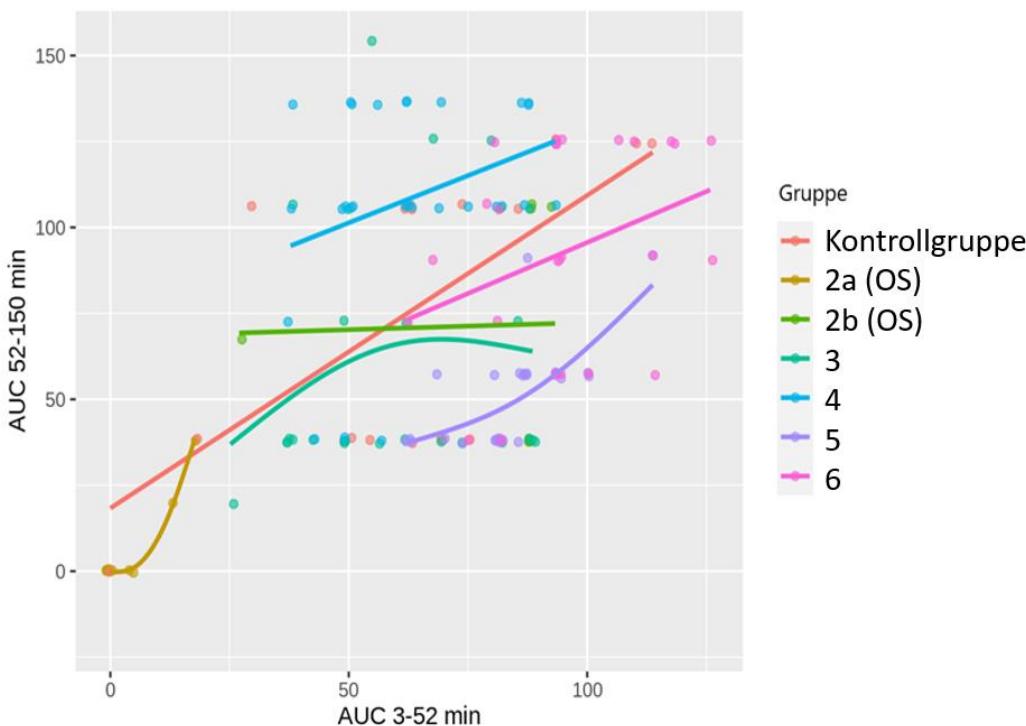
**Abbildung 50: A) und B) Beispielhafte Unterschiede der Rückentwicklung der Katarakt bei Betrachtung eines anterioren, horizontalen Linsenquerschnitts nach Beenden der Anästhesie; 7. Zeitpunkt  $t=90\text{min}$ , 8. Zeitpunkt  $t= 120\text{min}$ , 9.  $t=150 \text{ min}$**

In der Kontrollgruppe dauerte die Rückentwicklung der Katarakt durchschnittlich bis zu 107.7 Minute, in Gruppen 3 bis zur 101.5 Minute und in Gruppe 6 bis zur 113.07 Minute.

In Gruppe 4 hingegen dauerte die Rückentwicklung durchschnittlich 127.5 Minuten. An dieser Stelle sollte zudem erwähnt werden, dass die Mäuse der Gruppe 4 verglichen mit allen anderen Gruppen während der postanästhetischen Erholungsphase deutlich länger eine Ataxie und Desorientiertheit beobachten liessen.

Gruppe 5 zeigte mit circa 94.14 Minuten eine schnellere Rückentwicklung der Katarakt im Vergleich zur Kontrollgruppe.

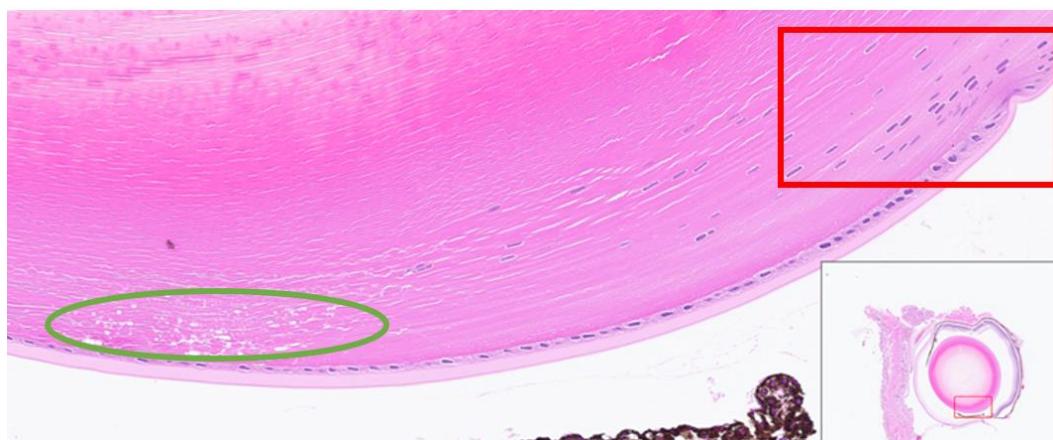
Da die Dauer der Kataraktrückentwicklung jedoch auch von der vorhergehenden maximalen Kataraktformation abhängig ist, wurde diese für einen Vergleich der Gruppen miteinbezogen. Dafür wurden die AUC-Werte während und nach der Anästhesie in Relation betrachtet (Abbildung 51). Der durchschnittliche Wert der Gruppe 4 war im Schnitt 32.72 höher als jener der Kontrollgruppe. Dies spricht für eine deutlich langsamere Rückentwicklung der Katarakt unabhängig vom zuvor erreichten Grad. Beim Vergleich der Gruppe 5 mit der Kontrollgruppe konnte anhand einer Differenz der AUC-Werte von -41.24 eine schnellere Rückentwicklung der Katarakt in Gruppe 5 bestätigt werden. Die Differenz der Werte der Gruppe 2a (OS) betrug -25.44, Gruppe 2b (OS) -18.19, Gruppe 3 -13.27 und Gruppe 6 -7.41.



**Abbildung 51:** AUC-Werte der Katarakt nach der Anästhesie (=Y-Achse) im Verhältnis zu den AUC-Werten während der Anästhesie (=X-Achse)

#### 4.3.5.2. Histologische Untersuchung der Gruppen 1 und 2

Bei Betrachtung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der Gruppen 1 und 2 konnten in nahezu jeder Linse anterior der germinativen Zone fokale Bereiche mit Vakuolen zwischen den Linsenfasern gefunden werden. Es wurden keine weiteren pathologischen Veränderungen festgestellt.



**Abbildung 52:** Beispielhafter Ausschnitt eines inferior-anterioren Linsenbereichs mit Kapsel, anteriorer Epithelzellschicht und Linsenfasern sowie fokaler Ausbildung von Vakuolen (Oval grün) vor der germinativen Zone (Kasten rot)

#### 4.3.6. Statistische Auswertung

Ein Einfluss der gruppenspezifischen Versuchsbedingungen auf die AUC-Werte der Kataraktgraduierung, der AKfB, der SHB und IRB konnte in einem ANOVA-

Effekttest statistisch signifikant gezeigt werden ( $p<0.05$ , Tabelle 17, Anhang 4).

Im Folgenden soll die Auswertung der statistischen Signifikanzen anhand eines paarweisen Vergleiches verschiedener Gruppen beschrieben werden. Die konkreten p-Werte aller ausgewerteten Parameter sind den entsprechenden Tabellen in Anhang 4 zu entnehmen.

### **Kataraktformation**

Der Vergleich der Gruppe 2 (OD) und Gruppe 1 ergab mit statistischer Signifikanz eine mildere Kataraktformation der Gruppe 2 (OD) mit Ausnahme der Parameter „maximale AKfB“ und „frühestes Auftreten von Grad 3“, welche lediglich einen Trend zur mildereren Kataraktformation der Gruppe 2 (OD) ohne statistische Signifikanz zeigten (Anhang 4, Tabelle 18).

Gruppe 2a (OS) zeigte für alle Parameter - ausser der maximalen Anzahl der Grade 3 – statistisch signifikant einen mildereren Verlauf der Kataraktformation verglichen mit Gruppe 2a (OD) (Anhang 4, Tabelle 19).

Ein signifikant schwerwiegenderer Verlauf der Gruppe 2b (OS) verglichen mit Gruppe 2b (OD) ergab sich bei Auswertung der AUC-Werte der Grade und der AKfB der Katarakt, sowie dem Auftreten von Grad 2 und höher. Die restlichen Parameter zeigten –mit Ausnahme des Erreichens der maximalen Anzahl von Grad 3 - einen schwerwiegenderen Trend der Gruppe 2b (OS), jedoch ohne das Erreichen einer statistischen Signifikanz (Anhang 4, Tabelle 20).

Zu beachten ist, dass aufgrund zu geringer Datenmengen die Parameter „frühestes Auftreten von Grad 2 und höher“ beziehungsweise „Grad 3“ sowohl in Gruppe 2a als auch 2b nicht statistisch auswertbar waren.

Der Vergleich der Gruppe 3 beziehungsweise 4 mit der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Katarakt (Anhang 4, Tabelle 21 und 22). Aufgrund zu weniger Datenpunkte, war in Gruppe 3 allerdings keine sichere Aussage über das früheste Auftreten von Grad 3 möglich. In Gruppe 4 konnte aufgrund des Fehlens ausreichender Daten die durchschnittliche maximale Anzahl und das früheste Erreichen von Grad 3 nicht vergleichend ausgewertet werden.

Für Gruppe 5 konnte gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant ein schwerwiegenderer Verlauf der Kataraktformation bezüglich des Maximums der SHB und IRB, sowie dem AUC der Grade, SHB und IRB festgestellt werden. Als einzige Abweichung des progressiveren Trends der restlichen Parameter – welche

keine statistische Signifikanz erreichten - trat Grad 3 in Gruppe 5 später auf als in der Kontrollgruppe (Anhang 4, Tabelle 23).

In Gruppe 6 war statistisch signifikant ein schwerwiegenderer Verlauf der Kataraktformation im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Lediglich das frühere Auftreten von Grad 3 erreichte keine statistische Signifikanz (Anhang 4, Tabelle 24).

Keine Gruppe erreichte statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der beiden Geschlechter (Anhang 4, Tabelle 25).

### **Linsendurchmesser**

Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Abnahme des Linsendurchmessers während der Anästhesie der verschiedenen Gruppen erreichten bei keinem paarweisen Vergleich statistische Signifikanz (siehe Anhang 4 Tabelle 26).

### **Augenkammertiefe**

Die stärkere Abnahme der Augenkammertiefe konnte statistisch signifikant für die Gruppen 1, 5 und 6 gegenüber der Kontrollgruppe (= Gruppe 2 (OD)) nachgewiesen werden (Anhang 4, Tabelle 27). Gruppe 2b (OS) zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede der Neigung der Abnahmekurve im Vergleich zu Gruppe 2b (OD), jedoch in Form einer geringeren Abnahme der Augenkammertiefe. Die Augenkammertiefenveränderung der Gruppen 2a (OS), 3 und 4 unterschieden sich nicht signifikant von der jeweiligen Vergleichsgruppe.

### **Corneadicke**

Die statistische Analyse bestätigte einen signifikanten Unterschied des Verlaufes der Corneadicke der Gruppe 2a (OS) beim Vergleich mit der Gruppe 2a (OD). Der Vergleich der restlichen Gruppen mit der jeweiligen Vergleichsgruppe hingegen ergab keine signifikanten Unterschiede (Anhang 4, Tabelle 28).

### **Mydriasis**

Ein Vergleich der durchschnittlichen Pupillenweite der Gruppen 2a (OS), 2b (OS), 3 und 5 mit der Kontrollgruppe zeigte signifikante Unterschiede in Form einer engeren Pupille in der Kontrollgruppe. Die im Vergleich mit der Kontrollgruppe gesteigerte Dilatation der Gruppe 4 und geringere Dilatation der Gruppen 1 und 6 erreichte keine statistische Signifikanz (Anhang 4, Tabelle 29).

## **Kataraktreversibilität**

Die P-Werte der statistischen Auswertung der Kataraktreversibilität können Tabelle 30 (Anhang 4) entnommen werden. Statistisch signifikant konnte eine langsamere Rückentwicklung der Gruppe 4 und eine schnellere Rückentwicklung der Gruppe 5 gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

### **4.4. Korrelation der Ergebnisse**

#### **4.4.1. Untersuchungs- und Auswertungsmethoden**

Im folgenden Abschnitt wurden allgemeine Zusammenhänge zwischen der Graduierung der Katarakt, der AKfB und der SHB/IRB geprüft. Die entsprechenden Abbildungen sind Anhang 5.1 zu entnehmen.

Die AUC-Werte der Kataraktgraduierung und der AKfB zeigten gruppenübergreifend eine positive Korrelation (Abbildung 83). Des Weiteren lag gruppenübergreifend und gruppenspezifisch eine positive Korrelation der beiden Parameter der OCT-Auswertung (SHB und IRB) vor (Abbildung 84 und 85). Vor allem mit zunehmender SHB und IRB war ein starker Zusammenhang der beiden Größen erkennbar. Im zeitlichen Verlauf der Anästhesie lagen generell kleinere, absolute Werte der IRB vor, jedoch verlief die relative Zunahme beider Parameter in allen Gruppen ähnlich (siehe Abbildung 86). Zudem korrelierten die Spaltlampenbefunde (Grad der Katarakt + AKfB) positiv mit der Auswertung der OCT-Befunde (SHB/IRB) (Abbildung 87).

#### **4.4.2. Kataraktformation und Linsendurchmesser**

In allen Versuchsgruppen konnte eine negative Korrelation in Form einer Abnahme des Linsendurchmessers mit Zunahme der SHB festgestellt werden. Diese Korrelation erreichte in den Gruppen 1, 4, 5 und 6 statistische Signifikanz (Anhang 5.2, Abbildung 88, Tabelle 31). Aufgrund der fehlenden Zunahme der SHB in Gruppe 2a (OS) konnte eine Korrelation dieser Parameter in dieser Gruppe nicht ausgewertet werden.

#### **4.4.3. Kataraktformation und Augenkammertiefe**

Mit der Zunahme der SHB des anterioren Linsenkortex war, vor allem bei Werten über 0.3mm, eine Tendenz zur gleichzeitigen Abnahme der Augenkammertiefe ersichtlich (Abbildung 89, Anhang 5.2). Dieser Trend erreichte in allen Gruppen,

ausser der Gruppe 2b (OS) statistische Signifikanz (Tabelle 32 Anhang 5.2). Auch hier konnte aufgrund der fehlenden Zunahme der SHB ein Zusammenhang in Gruppe 2a (OS) nicht ausgewertet werden. Der Zusammenhang mit der Abnahme der Augenkammertiefe konnte weiterhin auch bei gleichzeitiger Zunahme der Gradientwicklung und AKfB beobachtet werden (Abbildung 90, Anhang 5.2).

#### **4.4.4. Kataraktformation und Corneadicke**

Beim Vergleich der Veränderung der Corneadicke, konnte eine statistisch signifikante Korrelation der Abnahme der Corneadicke mit gleichzeitiger Zunahme der SHB aller Gruppen - ausser Gruppe 2b (OS) in welcher dieser Trend nur knapp keine statistische Signifikanz erreichte - gezeigt werden (Anhang 5.2, Tabelle 33, Abbildung 91). Da in den linken Augen der Gruppe 2a kaum eine Zunahme der SHB beobachtet werden konnte, konnte eine Korrelation in dieser Gruppe nicht geprüft werden.

#### **4.4.5. Kataraktformation und Mydriasis**

Zwischen der Pupillendilatation und der Zunahme der SHB konnte mit Ausnahme der Gruppe 4 und 5 keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden (Abbildung 92, Tabelle 34 Anhang 5.2). In Gruppe 4 wurde eine positive, in Gruppe 5 eine negative Korrelation der Mydriasis mit zunehmender SHB beobachtet.



## 5. Diskussion

Eine Katarakt kann Untersuchungen des posterioren Augensegmentes beeinflussen oder gar vollständig verhindern (5) und somit einen Verlust von Daten ophthalmologischer Studien herbeiführen oder diese verfälschen. Ziel dieser Arbeit war es, die Formation einer Katarakt bei Mäusen während der Allgemeinanästhesie unter verschiedenen, heutzutage praktisch üblichen Versuchsbedingungen zu untersuchen und beeinflussende Faktoren oder gar präventive Massnahmen zu finden und zu vergleichen. Die erzielten Ergebnisse tragen im Sinne des 3R (=Replace, Reduce, Refine) Konzepts von Russel et al (10) dazu bei das Tierwohl und die Tiergesundheit zukünftiger Studien zu verbessern und zudem den Erhalt auswertbarer Studiendaten zu sichern.

### 5.1. Methoden

#### 5.1.1. Ophthalmologische Untersuchung und Befundauswertung

Unserem Kenntnisstand zufolge kam in dieser Arbeit erstmals ein kommerziell erhältliches SS-OCT-Gerät (CASIA2, Tomey Corporation Japan, Nagoya, Japan) im Zusammenhang mit der Untersuchung der Kataraktformation anästhesierter Mäuse zum Einsatz. Diese Technik bringt den Vorteil einer beschleunigten Aufnahmegeschwindigkeit (93) und gesteigerten transversalen Auflösung (93) mit sich. Da das Gerät ursprünglich jedoch für die Anwendung am menschlichen Auge konzipiert wurde, mussten die Grösse des Aufnahmerasters, sowie die Helligkeit und der Kontrast der aufgenommenen B-Scans für die Spezies Maus angepasst werden. Die gewählten Einstellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst eruiert und definiert (siehe Kapitel 3.2.2.1).

Ein einheitliches und standardisiertes System zur Beurteilung der Katarakt anästhesierter Mäuse konnte der Literatur nicht entnommen werden. In bisherigen Studien erfolgte die Beurteilung der Spaltlampenbefunde meist auf Grundlage des LOCS-Systems, welches nach der Studiendurchführung anhand der jeweiligen Studienergebnisse in unterschiedlichem Ausmass an die Befunde der Katarakt adaptiert wurde (1, 4, 8, 9, 67). Alternativ entwickelten die Autoren selbständig ein Graduierungssystem infolge ihrer Beobachtungen (2, 7). Um in dieser Arbeit bereits vor der Versuchsdurchführung ein Bewertungssystem festzulegen, wurde die Katarakt gemäss ihrem Schweregrad (incipient (Grad 1), matur (Grad 2),

immatur (Grad 3), siehe Kapitel 2.2.3.2 und 3.2.5.1) eingeteilt. Dieses System wurde kombiniert mit einer separaten Dokumentation der Lokalisation und der Ausdehnung der Katarakt bei frontaler Betrachtung, was eine präzise und detaillierte Beschreibung der Katarakt ermöglichte.

Auch das manuelle Verfahren zur quantitativen Ausmessung des hyperreflektiven Signals der Katarakt auf den OCT B-Scans, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit selbst entwickelt. Software-integrierte, automatische Messverfahren konnten aufgrund der, gegenüber dem menschlichen Auge variierenden, absoluten und relativen Größenverhältnisse des Mausauges (siehe Kapitel 2.3.1) nicht zur Ergebnissauswertung verwendet werden. Die positive Korrelation der Befunde der in dieser Arbeit neu eingeführten Messmethode mit jenen der Spaltlampenuntersuchung (siehe 4.4.1) zeigt, dass beide Untersuchungsmethoden im Einklang sind und ergänzend zur Ergebnissauswertung herangezogen werden können.

### **5.1.2. Auswahl verschiedener Versuchsbedingungen**

Um potentielle Unterschiede der Kataraktformation infolge verschiedener Versuchsbedingungen sicher auf einen Faktor zurückführen zu können, wurde nur jeweils einer der Faktoren zwischen den Versuchsgruppen variiert.

#### **Corneabefeuchtung**

Wie und in welcher Menge die feuchthaltenden Substanzen auf die Cornea aufgetragen wurden, wird in bisherigen Studien (1, 4, 9, 67) nicht erläutert. Der Einsatz einer Eppendorf pipette ermöglicht erfahrungsgemäß eine deutlich präzisere Applikation kleinerer Mengen verglichen mit jener nach Verwendung einer 1ml-Feindosierungsspritze. Aufgrund dessen wurde der potentielle Einfluss dieser Applikationsmethoden auf die Kataraktformation untersucht.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss unterschiedlicher Substanzen zur Corneabefeuchtung der rechten und linken Augen der Gruppe 2 vergleichend untersucht (siehe 3.2.3.1). Aufgrund des tierinternen Vergleiches beider Augen wurden zeit-, batch- und individuenbedingte Unterschiede minimiert, was das Erreichen einer statistischen Signifikanz der Ergebnisse unterstützte.

#### **Mydriatikum**

Der Einfluss eines Mydriatikums verglichen mit einer Kombination zweier

Mydriatika auf die Formation des Kataraktes wurde während der Allgemeinanästhesie in dieser Arbeit erstmals untersucht.

### **Anästhesieprotokoll**

Ausschlaggebend für die Wahl der Injektionsanästhesie war, dass keine Atemmaske am Kopf der Mäuse benötigt wurde. Diese stellt erfahrungsgemäß einen erheblichen mechanischen Störfaktor im Zusammenhang mit ophthalmologischen Untersuchungen dar.

Während einige der bisherigen Studien heutzutage nicht mehr empfohlene Anästhetika einsetzen (4, 8, 9, 64) (siehe 2.3.9), wurden im Rahmen dieser Arbeit zeitgemäße Protokolle gewählt.

Ein Vorteil des Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-Protokolls ist die Möglichkeit einer vollständigen Antagonisierung, was eine deutlich kürzere Aufwachphase mit sich bringt (62). Verwendet wurde die von Fleischmann et al (62) empfohlene Dosierung. Das Xylazin-Ketamin-Protokoll, welches in bisherigen Studien mit unterschiedlichen Dosierungen verwendet wurde (1-3), diente zum Vergleich. Laborinternen Erfahrungswerten zufolge hat sich für dieses Protokoll eine Dosierung von 13mg/kg Xylazin und 65mg/kg Ketamin bewährt.

### **Mausstamm**

Berichten zufolge sind C57BL/6J und BALB/c häufig eingesetzte Mausstämme im Forschungsalltag (94), weshalb deren Verwendung die Relevanz dieser Arbeit für viele *in vivo* Studien am Tiermodell Maus gewährleistet. Eine vergleichende Untersuchung der Kataraktformation verschiedener Mäusestämme unter heutzutage praktisch üblichen Bedingungen liegt unserem Kenntnisstand zufolge in der Literatur nicht vor.

### **Externe Wärmezufuhr**

Eine kontinuierliche Überwachung und Dokumentation der Körpertemperatur gemeinsam mit der ophthalmologischen Untersuchung der Katarakt anästhesierter Mäuse wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Caro et al (95) konnten einen Wärmeverlust anästhesierter Mäuse anhand einer einseitigen, 38 Grad Celsius temperierten, externen Wärmezufuhr bei Raumtemperatur gegenüber einer Vergleichsgruppen ohne externe Wärmezufuhr reduzieren, jedoch nicht gänzlich verhindern. Eine Studie an menschlichen Patienten zeigte, dass die

Körpertemperatur unter Verwendung eines Temperaturmanagementsystems (=TMS) besser aufrechterhalten werden kann, als mit Hilfe einer alleinigen, einseitigen Wärmezufuhr via Wärmepad (96). Um den Einfluss einer solchen zusätzlichen, verbesserten externen Wärmezufuhr auf die Körpertemperatur und die Kataraktformation anästhesierter Mäuse zu untersuchen, kam in einer Versuchsgruppe zusätzlich zu einer elektrischen Wärmematte ein TMS zum Einsatz.

## 5.2. Ergebnisse

### 5.2.1. Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese

Im Folgenden werden mögliche Hypothesen zur Ursache und Entstehung der Katarakt anästhesierter Mäuse diskutiert.

Eine zunehmende Dehydratation des Linsengewebes (physiologisch dehydrierter Flüssigkeitshaushalt des Linsengewebes siehe 2.1.2) stellt eine potentielle Ursache der Katarakt dar:

Der verminderte Wassergehalt äussert sich in einer Reduktion des Zellvolumens (97) und erklärt die Abnahme des Linsendurchmessers, was mit zunehmender Kataraktformation auf den zweidimensionalen OCT B-Scans aller Versuchsgruppen festgestellt wurde. Zudem geht mit der Reduktion des Wassergehaltes eine Erhöhung des relativen Proteingehaltes der Linsenfasern und eine Aggregation der Proteine einher (68), insbesonders jener der Intermediärfilamente des Zytoskelettes (73). Da die Form der Linsenzellen/-fasern ebenso wie die ursprüngliche, zytoplasmatische Proteinlösung für die Transparenz der Linse essentiell sind (siehe 2.1.2), führt im Umkehrschluss eine Reduktion des Zell-/Faservolumens und Aggregation der Proteine infolge der Dehydratation zu einem Verlust der Linsentransparenz.

Die mit zunehmender Kataraktformation einhergehende Abnahme der Augenkammertiefe auf den zweidimensionalen OCT B-Scans, lässt auf einen Zusammenhang der Katarakt beziehungsweise der Linsendehydratation mit einer Reduktion des Kammerwasservolumens schliessen.

Eine Ursache des reduzierten Kammerwasservolumens ist eine anästhesiebedingte Reduktion der Kammerwasserproduktion (98). Diese erklärt die generelle Tendenz zur Abnahme der Kammertiefe, aufgrund der identischen Prozedur der Anästhesie jedoch nicht die festgestellten Unterschiede der Augenkammertiefe zwischen den

entsprechenden Gruppen (siehe 5.2.2).

Ein alternativ denkbarer, vermehrter uveoskleraler und trabekulärer Abfluss des Kammerwassers während der Anästhesie kann gemäss Camras et al (99) als Ursache der Reduktion des Kammerwasservolumens ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Ursache der Kammerwasserreduktion ist ein transcornealer Verlust von Flüssigkeit: Donn et al (100) konnten *in vitro* eine Wasserdurchlässigkeit der Cornea in beide Richtungen – sowohl von der Corneaoberfläche in die Augenkammer, als auch umgekehrt – zeigen. Der Flüssigkeitsaustausch zwischen Augenkammer und Corneastroma wird über das Corneaendothel reguliert (101). Diskontinuierliche Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen ermöglichen eine Barrierefunktion des Corneaendothels zwischen Corneastroma und Augenkammer mit einer hohen Permeabilität für hydrophile Substanzen (102). Im physiologischen Zustand sorgt eine - durch die Glykosaminoglykan-Konzentration bedingte - Hyperosmolarität des Corneastromas für einen passiven, parazellulären Flüssigkeitseinstrom aus dem Kammerwasser über das Corneaendothel in das Corneastroma (102, 103). Dem stehen verschiedene Ionentransporter und Aquaporinkanäle der Corneaendothelzellen entgegen, welche einen aktiven Fluss von Ionen und damit einhergehend einen Flüssigkeitsausstrom aus der Cornea in das Kammerwasser bewirken (102, 104). Aus diesen Prozessen resultiert folglich ein konstanter, im Gleichgewicht stehender Austausch von Flüssigkeit zwischen Corneagewebe und Augenkammer (102). Das Corneaepithel hingegen weist aufgrund von Tight junctions zwischen den Epithelzellen kaum eine parazelluläre Ionen-/Flüssigkeitsdurchlässigkeit auf (104). Daher wird an der Corneaoberfläche lediglich ein aktiver Ionen- und Flüssigkeitsaustausch über membranständige Ionentransport- und Aquaporinkanäle der Epithelzellen angenommen (104).

Der transcorneale Flüssigkeitsaustausch kann anhand von Veränderungen des Flüssigkeitsfilms auf der Corneaoberfläche beeinflusst werden (100). Ein gesteigerter, transcornealer Flüssigkeitsstrom aus dem Kammerwasser in das Corneagewebe und auf die Corneaoberfläche, infolge der während der Versuchsdurchführung veränderten Bedingungen auf der Corneaoberfläche, kann somit die im Verlauf der Anästhesie beobachtete Abnahme der Kammertiefe erklären. Zudem können aufgrund verschiedener Eigenschaften der Flüssigkeiten auf der Corneaoberfläche die bezüglich der Kammertiefenabnahme festgestellten

Unterschiede der jeweiligen Gruppen (siehe 4.3.1.3 und 4.3.3.3) erklärt werden (siehe späteres Kapitel 5.2.2).

Infolge eines transcornealen Flüssigkeitsverlustes wird eine Erhöhung der relativen Ionenkonzentration, sprich der Osmolarität, des verbleibenden Kammerwassers angenommen (7, 70). *In vitro* Studien konnten nach Erhöhung der Osmolarität des die Linse umgebenden Mediums sowohl den Zusammenhang zur Reduktion des Wassergehaltes der Linse (105, 106) als auch einer anterioren Kataraktformation (70) nachweisen.

Durch die Erhöhung der Osmolarität wird der osmotische Gradient, welcher physiologisch für einen Wassereinstrom in das Linsengewebe sorgt (siehe 2.1.2 „Dehydrierter Status des Linsengewebes“) reduziert oder gar umgekehrt, was zu einer gesteigerte Dehydratation des anterioren Linsengewebes führt.

Auch der in dieser Arbeit beobachtete Verlauf der Katarakt - ausgehend von den anterioren Linsennahtlinien in Richtung des Linsenequators und nuklear befindlichen Kortexschichten – spricht für eine Beeinflussung des Linsengewebes infolge einer Osmolaritätserhöhung des volumenreduzierten Kammerwassers: Im Bereich der anterioren Linsennahtlinien liegen grössere parazelluläre Spalträume (107) und geringere Widerstände des parazellulären Transportes (108) des Linsengewebes vor. Infolgedessen ist aufgrund hyperosmotischer Veränderungen des Kammerwassers zunächst entlang der anterioren Linsennahtlinien ein gravierenderer extra- und intrazellulärer Flüssigkeitsverlust des Linsengewebes denkbar, welcher die beobachtete anfängliche Kataraktformation entlang der anterioren Nahtlinien erklären kann. Eine Beeinflussung benachbarter Zellen und Fasern über Gap junctions (26) kann anschliessend sekundär die Ausbreitung der Katarakt im anterioren Linsengewebe in Richtung peripherer und nuklearer Kortexschichten erklären.

Des Weiteren führt der Verlust von Kammerwasserflüssigkeit zu einem grösseren Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Kammerwassers zur Linsenoberfläche. Dies könnte dazu beitragen, dass Veränderungen der Kammerwasserzusammensetzung sich stärker auf den Flüssigkeitshaushalt des Linsengewebes auswirken, als dies bei Erhalt des Kammerwasservolumens der Fall wäre.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Dehydratation des anterioren Linsengewebes und eine Reduktion des Kammerwasservolumens, sowie eine daraus resultierende Erhöhung der Kammerwasserosmolarität im

Zusammenhang mit der Katarakt hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen somit die von Fraunfelder et al (7) aufgestellte Pathogenesetheorie einer osmotisch bedingten Katarakt. Eine solche Dehydratation des Linsengewebes wurde im Zuge der Kataraktformation anästhesierter Mäuse bereits mehrfach mit Bezug auf die Osmolaritätstheorie von Fraunfelder et al (7) in der Literatur diskutiert (1, 8, 58, 68, 70).

Die Beschreibung der kältebedingten Katarakt von Li et al (68), welche *in vitro* einen Verlauf ausgehend von nukleären Kortexschichten in Richtung der Peripherie beobachteten, lässt aufgrund der Unterschiede zum Verlauf im Rahmen dieser Arbeit die Pathogenesetheorie der kalten Katarakt unwahrscheinlich erscheinen. Auch die in dieser Arbeit festgestellte Kombination von Zunahme der Körpertemperatur mit gleichzeitig schwerwiegenderer Kataraktformation widerspricht der Theorie der kalten Katarakt, welche eine Zunahme der Kataraktformation mit abnehmender Körpertemperatur erwarten lässt (siehe 2.3.3). Wirkstoffspezifische Mechanismen der Anästhetika (siehe 2.3.3) können als Ursache der Katarakt infolge dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund fehlender Unterschiede der Kataraktformation infolge der Applikation zweier Anästhesieprotokolle (siehe Tabelle 22 Anhang 4), sowie den gravierenden Unterschieden nach Variation weiterer Versuchsbedingungen (Anhang 4 Tabelle 18-20, 23, 24), können diese als primäre Ursache der Katarakt jedoch hintenangestellt werden.

Oxidative Zellschäden, deren Vermeidung für die Transparenz der Linse entscheidend sind (siehe 2.1.2), scheinen als Ursache der Katarakt ebenfalls unwahrscheinlich: Die langsame Entwicklung über mehrere Tage bis Wochen (109) und die Irreversibilität (110) der daraus hervorgehenden Katarakt widerspricht den Beobachtungen dieser Arbeit. Auch ein Zusammenhang der Katarakt mit einem Flüssigkeitseinstrom und einer Faserschwellung des Linsengewebes, wie er im Zuge andersweitig ausgelöster Kataraktformen wie der postoperativen oder diabetischen Katarakt berichtet wird (25, 82), kann hintenangestellt werden: Ein solcher würde eine Zunahme anstelle einer Abnahme des Linsendurchmessers erwarten lassen.

## **5.2.2. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen während der**

**Anästhesie****5.2.2.1. Versuchsteil 1**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Art der Corneabefeuchtung massgeblich die Kataraktformation beeinflusst: Der Einsatz einer Pipette mit Applikation 5µl grosser Tropfen auf die Corneaoberfläche hatte - im Vergleich mit der Verwendung einer Feindosierungsspritze und 50µl grossen Tropfen - eine signifikant mildere Kataraktformation zur Folge. Lediglich die Parameter „Maximale AKfB“ und „Frühestes Auftreten von Grad 3“ zeigen nur einen Trend zur schwerwiegenderen Entwicklung ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. Eine mildere Kataraktformation nach Natriumhyaluronat-Augengel-Applikation gegenüber der Applikation von Hypromellose-/Natriumchloridlösung konnte mit Ausnahme der maximalen Anzahl an Grad 3 für alle Parameter signifikant gezeigt werden. Der Vergleich dieser beiden Substanzen lies die grössten Unterschiede bezüglich der Kataraktformation im Rahmen des ersten Versuchsteils dieser Arbeit erkennen. Infolge der Applikation von Hypromellose- und Natriumchloridlösung (Protokoll 2, OD Gruppe 2b) konnte ein signifikant milderer Verlauf der AUC-Werte der Kataraktgrade und der AKfB gegenüber einer alleinigen Natriumchloridapplikation (Protokoll 4, OS Gruppe 2b) beobachtet werden. Mit Ausnahme der maximalen Anzahl an Grad 3 zeigen die restlichen auswertbaren Parameter einen Trend zu milderer Kataraktformation mit Hypromellose, erreichen jedoch keine Signifikanz.

**Diskussion potentiell ursächlicher Faktoren der unterschiedlichen Kataraktformation**

Variationen der Menge, der Bestandteile, der Osmolarität und Viskosität der applizierten Substanzen auf der Corneaoberfläche stellen aufgrund einer unterschiedlichen Beeinflussung des transcornealen Flüssigkeitsaustausches mögliche Ursachen der beobachteten Unterschiede der Kataraktformation der jeweiligen Versuchsgruppen dar:

Trotz Applikation vergleichsweise grösserer Tropfen per Feindosierungsspritze wurde ein deutlich geringerer Flüssigkeitsgehalt auf der Corneaoberfläche gegenüber der Verwendung einer Pipette festgestellt. Das vermehrte Abrutschen der grösseren Tropfen - bedingt durch eine höhere Schwerkrafteinwirkung oder infolge einer geringeren Oberflächenspannung - erklärt diesen Befund.

Die resultierende Exposition von Teilen der Corneaoberfläche gegenüber der Umgebungsluft nach Verwendung der Feindosierungsspritze geht auf den OCT B-Scans dieser Arbeit mit einer vergleichsweise tendentiell gravierenderen Abnahme der Corneadicke und signifikant flacheren Augenkammer einher. Dies ist hinweisend auf einen vermehrten Flüssigkeitsverlust der Cornea (111) und des Kammerwassers (7). Die Daten dieser Arbeit legen somit nahe, dass ein initial kompensatorischer Mechanismus der Austrocknung der Corneaoberfläche entgegensteuert, welcher sekundär die Formation der Katarakt anästhesierter Mäuse zur Folge hat. Die tendentiell stärkere Reduktion des Linsendurchmessers nach Verwendung der Feindosierungsspritze unterstützt die Hypothese einer variierenden Corneadehydratation als Ursache der Unterschiede der Kataraktformation infolge der verschiedenen Applikationsmethoden. Im histologischen Schnittbild kann eine Dehydratation im Allgemeinen nicht beurteilt werden, da diese auch als Folge der Verarbeitung des Gewebes entstehen kann (112).

Die Dehydratation kann schliesslich zu einer Expositionskeratitis (113) mit Apoptose der Corneaepithelzellen (114) und einer gesteigerten Permeabilität des Corneaepithels (115) führen. Ein infolgedessen gesteigerter Flüssigkeitsverlust des Corneagewebes könnte einen erhöhten osmotischen Gradienten und folglich einen vermehrten Flüssigkeitsstrom aus dem Kammerwasser auf die Corneaoberfläche bewirken. Der Flüssigkeitsverlust könnte die vergleichsweise stärkere Abnahme der Corneadicke und der Augenkammertiefe und gemäss Kapitel 5.2.1 die schwerwiegender Kataraktformation nach Verwendung der Feindosierungsspritze erklären. Allerdings konnten der histologischen Untersuchung keine Hinweise auf eine Apoptose der Corneaepithelzellen entnommen werden. Auch die Spaltlampenuntersuchung lies keine Anzeichen einer Expositionskeratitis - in Form oberflächlicher, punktförmiger Erosionen oder Corneaulzerationen (116) - vermuten.

Der Flüssigkeitsgehalt der Corneaoberfläche, sprich die Luftexposition, variierte jedoch kaum infolge der verschiedenen, per Pipette applizierten Substanzen. Daher müssen weitere potentielle Einflussfaktoren wie die Bestandteile der Befeuchtungsprotokolle als Ursache der unterschiedlichen Kataraktformation in Betracht gezogen werden.

Das im Hypromellosepräparat enthaltene Konservierungsmittel

Benzalkoniumchlorid ist als epitheltoxisch beschrieben (117). Aufgrund einer Beschädigung des Corneaepithels ist - wie auch zuvor als Folge einer Luftexpositions-bedingten Zellapoptose – eine Erhöhung der Corneapermeabilität und ein Flüssigkeitsverlust, sowie folglich eine schwerwiegendere Kataraktformation gegenüber konservierungsmittelfreien Präparaten - wie dem Natriumhyaluronat-Präparat (118) - denkbar. Das in der histologischen Untersuchung intakte Corneaepithel lässt allerdings epitheltoxische Wirkungen des Benzalkoniumchlorids als ursächlichen Faktor hintenanstellen.

Einen weiteren Unterschied stellt die Natriumkonzentration der verschiedenen Präparate dar. Während gemäss Herstellerangaben im Hypromellose-Präparat kein Natrium enthalten ist, ist im Natriumhyaluronat-Augengel eine geringe (0,15mg/ml Natriumhyaluronat = umgerechnet 0,374mmol/L), in der Natriumchloridlösung eine hohe Natriumkonzentration (=154mmol/L) vorhanden. Im Vergleich zum physiologischen Natriumgehalt der Tränenflüssigkeit der Maus mit  $139 \pm 8$  mMol/L (119), ist der Natriumgehalt der Natriumchloridlösung somit höher, jener des Natriumhyaluronat-Präparates geringer. Zu beachten ist, dass trotz fehlendem Natriumgehalt des Hypromellosepräparates jener des Hypromellose-Natriumchloridlösung-Protokolls infolge der wiederholten Applikation der Natriumchloridlösung im Verlauf der Anästhesie steigt.

Der Flüssigkeitstransport des Corneaepithels ist an den Ionentransport über membranständige Transportkanäle gebunden (siehe 5.2.1), wobei Natriumionen von der Corneaoberfläche in die Epithelzellen aufgenommen und im Gegenzug Chlorid-, Wasserstoffionen und Flüssigkeit abgegeben werden (104). Ein vermehrter Flüssigkeitsausstrom infolge des erhöhten Natriumgehaltes beziehungsweise vermehrten Austausches nach Applikation der Natriumchloridlösung auf der Corneaoberfläche könnte somit die Abnahme der Corneadicke erklären. Green et al (120) beobachteten umgekehrt eine ansteigende Corneadicke bei vergleichsweise geringerer Natriumkonzentration auf der Corneaoberfläche. Dies könnte aufgrund eines verminderten Natriumeinstroms und Flüssigkeitausstroms erklärt werden. Folglich stellt die unterschiedliche Natriumkonzentration der Befeuchtungsprotokolle eine mögliche Ursache für die Zunahme des Flüssigkeitsgehaltes und die dicker werdende Cornea der Natriumhyaluronat-behandelten Augen und der demgegenüber dünner werdenden Cornea der Hypromellose-/Natriumchloridlösung-behandelten Augen dar, sowie

die Ursache der vergleichsweise dickeren Cornea der Hypromellose-/Natriumchloridlösung-behandelten gegenüber den mit alleiniger Natriumchloridlösung behandelten Augen.

Im Zusammenhang mit der dickeren Cornea konnte eine durchschnittlich tiefere Augenkammer der Natriumhyaluronat applizierten Gruppe ohne signifikante Unterschiede der Abnahme der Kammertiefe gegenüber der mit Hypromellose-Natriumchloridlösung behandelten Gruppe festgestellt werden. Die vergleichsweise tiefere Augenkammer deutet auf einen geringeren Verlust von Kammerwasser hin, was wiederum die mildere Kataraktformation infolge des Natriumhyaluronatpräparates erklären kann.

Der signifikant geringere Abfall der Kammertiefe infolge der alleinigen Applikation der Natriumchloridlösung kann bei Betrachtung von Abbildung 32 anhand einer bereits bei der ersten Messung deutlich flacheren Augenkammer erklärt werden. Diese ist hinweisend auf einen stärkeren Verlust von Kammerwasserflüssigkeit vor der ersten Messung und eine dementsprechend beobachtete progressivere Kataraktentwicklung zu Beginn der Anästhesie.

Ein weiterer, potentieller Einflussfaktor für die festgestellten Unterschiede der Kataraktformation ist die variierende Osmolarität der einzelnen Substanzen.

Die physiologische Osmolarität des Tränenfilms von Mäusen liegt bei circa 314mOsmol/L (9, 119). Das Natriumhyaluronat-Präparat weist lediglich eine Osmolarität von 200mOsmol/L auf (118). Eine Applikation dieses Präparates führt folglich zu hypoosmolaren Bedingungen auf der Corneaoberfläche. Dies hat osmotisch-bedingt einen Flüssigkeitseinstrom über Aquaporinkanäle in das Corneagewebe zur Folge (103) und äussert sich anhand der Dickenzunahme der Cornea (58). Im Zusammenhang mit der tieferen Augenkammer kann die vergleichsweise mildere Kataraktformation somit auch anhand der Osmolarität erklärt werden.

Demgegenüber ist die Osmolarität der Hypromellose-Lösung gemäss Herstellerangaben isoton zur Tränenflüssigkeit. Da es sich um ein für den Menschen zugelassenes Präparat handelt, ist von der Osmolarität des humanen Tränenfilms, sprich 305-310mOsm/l (121), auszugehen. Die Osmolarität der Natriumchloridlösung liegt gemäss der Herstellerangaben bei 309mOsm/l. Die fehlenden Unterschiede der Osmolarität des Hypromellose und Natriumchloridpräparates lassen keine unterschiedliche Beeinflussung des

Mausauges infolge der Applikation der kombinierten Hypromellose-Natriumchloridlösung und alleiniger Natriumchloridlösung erwarten. Da dennoch Unterschiede festgestellt wurden kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass die Osmolarität einen bedeutsamen, jedoch nicht alleinigen Einflussfaktor der Kataraktformation darstellt.

Die unterschiedliche Viskosität der applizierten Substanzen könnte ebenfalls die beobachteten Unterschiede der Kataraktformation und der Augenkammertiefe erklären: Hochvisköse Lösungen wie das Natriumhyaluronat- und Hypromellosepräparat haben eine längere Verweildauer auf der Corneaoberfläche (118, 122). Folglich bieten sie einen längeren Schutz vor einer Beeinflussung des Wasserhaushaltes der Cornea und Augenkammer. Allerdings wurde gemäss der eingesetzten Befeuchtungsprotokolle dieser Arbeit eine relativ hohe Applikationsfrequenz verwendet und es wurden keine nennenswerten Unterschiede des Flüssigkeitsfilms auf der Corneaoberfläche infolge der verschiedenen Substanzen beobachtet. Daher kann angenommen werden, dass mit den verwendeten Mengen die Aufenthaltsdauer aller Substanzen über dem gewählten Applikationsintervall liegt. Die Viskosität der Flüssigkeiten kann somit als primäre Ursache des unterschiedlichen Flüssigkeithaushaltes der Cornea/Augenkammer und Linse, sowie der unterschiedlichen Kataraktformation im Rahmen dieser Arbeit hintenangestellt werden.

Neben der Befeuchtung der Corneaoberfläche kann die Körpertemperatur als beeinflussender Faktor (siehe 2.3.3) der variierenden Kataraktformation diskutiert werden. Die Körpertemperatur der Gruppe 1 lag durchschnittlich über jener der Gruppe 2 (OD). Eine kältebedingte Steigerung der Katarakt, wie sie im Sinne der kalten Katarakt vermutet wird (siehe 2.3.3), konnte infolgedessen nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurden auch bei einem tierinternen Vergleich Unterschiede der Kataraktformation zwischen beiden Augen festgestellt, welche sich nicht anhand systemischer Faktoren wie der Körpertemperatur erklären lassen.

### **Komplikationen:**

Infolge der Natriumhyaluronatapplikation wurde mehrfach ein Corneaödem beobachtet. Das Ödem stellt folglich eine Komplikation des applizierten Natriumhyaluronat-Augengels dar. Eine mögliche Erklärung sind die hypoosmolaren Bedingungen, welche gemäss Ni et al (58) eine osmotisch

bedingten Schwellung der Cornea verursachen. Wie erläutert könnte jedoch auch die geringe Natriumkonzentration des Präparates die Entstehung des Corneaödem erklären. Der Literatur konnten keine Hinweise auf das gehäufte Auftreten eines Ödems bei Anwendung von Natriumhyaluronat-Augengel am menschlichen Auge entnommen werden (118). Allerdings erfolgt die Applikation beim Menschen entsprechend der Herstellerangaben im Abstand mehrerer Stunden. Zudem besitzt das menschliche Auge eine erheblich grössere Oberfläche verglichen mit dem Mausauge (123). Dies könnte erklären, weshalb die Osmolarität des menschlichen Tränenfilms (physiologisch 305-310mOsm/l (121)) weniger stark reduziert wird und infolge der geringeren Applikationsfrequenz ein Ödem der menschlichen Cornea nicht so häufig wie bei den anästhesierten Mäusen dieser Arbeit beobachtet werden kann.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und des Linsendurchmesser**

Unterschiede der Abnahme des Linsendurchmessers zwischen den Gruppen gehen insofern mit jenen der Kataraktformation einher, dass eine vergleichsweise schwerwiegender Kataraktformation mit einer tendentiell gravierenderen Abnahme des Linsendurchmessers auftrat. Auch der durchschnittlich grössere Linsendurchmesser und die geringere Abnahme des Linsendurchmessers infolge der Natriumhyaluronatbehandlung entsprachen der vergleichsweise milderden Kataraktformation dieser Gruppe. Dies unterstützt die zuvor diskutierte These eines Zusammenhangs des Linsendurchmessers mit der Kataraktformation.

Der vergleichsweise grössere absolute Linsendurchmesser der Gruppe 1 beruht vermutlich auf charge- oder tierbedingten Unterschieden.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und der Augenkammertiefe**

Die Abnahme der Kammertiefe im Zusammenhang mit der zunehmenden Kataraktformation ist komplexer, weshalb nicht allein die statistisch ausgewertete Abnahme (= Vergleich der negativen Trendwerte, siehe Tabelle 27 Anhang 4) während des gesamten Anästhesieverlaufes, sondern auch Unterschiede der Durchschnittswerte und einzelner Messzeitpunkte (siehe Abbildung 32 Kapitel 4.3.1.3) beachtet werden müssen:

Infolge der Verwendung einer Feindosierungsspritze resultiert neben einer

schwerwiegenderen Kataraktformation eine vergleichsweise signifikant stärkere Abnahme der Augenkammertiefe, was sich zu allen Messzeitpunkten zeigte. Dies entspricht den Erwartungen der unter 5.2.1 beschriebenen Pathogenesetheorie. Der Durchschnittswert der Kammertiefe hingegen ist höher als jener der Vergleichsgruppe. Da einzig in dieser Gruppe zudem ein durchschnittlich grösserer Linsendurchmesser beobachtet wurde, sind die Grössenunterschiede vermutlich eher durch die Tiercharge, anstelle versuchsbedingter Einflüsse bedingt. Ein solcher Effekt kann in den restlichen Gruppen des ersten Versuchsteils aufgrund des tierinternen Vergleichs ausgeschlossen werden.

Nach alleiniger Applikation von Natriumchloridlösung hingegen geht die vergleichsweise schwerwiegendere Kataraktformation mit einer signifikant geringeren Abnahme der Kammertiefe und einem identischen Durchschnittswert einher. Allerdings ist bereits zu Beginn der Anästhesie eine vergleichsweise deutlich geringere Augenkammertiefe erkennbar (Abbildung 32C). Diese ist mit einer zu Beginn schwerwiegender verlaufenden Kataraktformation konform. Trotz weniger abfallendem Trendwert und identischer Kammertiefe könnte eine schwerwiegendere Kataraktformation infolge der alleinigen Natriumchloridapplikation somit aufgrund einer bereits vor dem ersten Messzeitpunkt stattfindenden Reduktion der Kammertiefe erklärt werden. Mit Fortschreiten der Anästhesie entsprach der stagnierende Verlauf der Kammertiefe infolge der alleinigen Applikation der Natriumchlroidlösung dem stagnierenden Verlauf der Katarakt.

Bei den Natriumhyaluronat behandelten Augen resultierte mit der milderer Kataraktformation eine Abnahme der Kammertiefe ohne signifikante Unterschiede zur Hypormellose-Natriumchloridbehandelten Gruppe. Die durchschnittlich grössere Kammertiefe, sowie die höheren Werte bis zum Zeitpunkt t=42 Minuten hingegen waren konform mit der vergleichsweise milderer Kataraktformation. Dass die durchschnittlichen Werte der Kammertiefe infolge der Natriumhyaluronatapplikation bereits beim ersten Messzeitpunkt höher sind, deutet auf einen Flüssigkeitseinstrom in die Augenkammer vor der ersten Messung hin. Die folglich zu Beginn der Anästhesie vergleichsweise tiefere Augenkammer auf den B-Scans spricht für ein erhöhtes Kammerwasservolumen. Dies könnte unter der Annahme, dass eine Kataraktformation erst bei Erreichen eines Schwellenwertes der Kammerwasserreduktion und der daraus resultierenden

Erhöhung der Kammerwasserosmolarität resultiert, sowie infolge der nicht signifikant unterschiedlichen, anästhesiebedingten Abnahme der Kammertiefe, die erst gegen Ende der Anästhesie sehr geringgradige Kataraktentwicklung der Natriumhyaluronat-behandelten Gruppe erklären.

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Interpretation der Unterschiede der Kammertiefe anhand des Gesamtbildes anstelle einzelner Parameter erfolgen muss. In allen Gruppen konnte unter Einbezug dieses Gesamtbildes letztendlich eine Übereinstimmung der Kammerwasserveränderung mit der Kataraktformation gezeigt werden.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und der Corneadicke**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Abnahme der Corneadicke mit zunehmender Kataraktformation beobachtet. Neben der statistischen Auswertung der Abnahme der Corneadicke wird im folgenden die durchschnittliche Corneadicke und der Verlauf jener in die Auswertung miteinbezogen.

Eine schwerwiegender Kataraktformation infolge der Verwendung einer Feindosierungsspritze geht mit einer durchschnittlich zu allen Messzeitpunkten dünneren Cornea und einer stärkeren Abnahme der Corneadicke einher, wobei letztere keine Signifikanz erreicht. Die mildere Kataraktformation der Natriumhyaluronatbehandelten Augen zeigt dementsprechend zu allen Messzeitpunkten eine dickere Cornea und eine Zunahme der Corneadicke. Analog zur schwerwiegenderen Kataraktformation lag auch infolge der Applikation von Natriumchloridlösung eine durchschnittlich dünnere Cornea vor. All dies spricht für den Zusammenhang des Flüssigkeitsverlustes der Cornea mit der Kataraktformation.

Die Abnahme der Corneadicke infolge der Natriumchlorid-Applikation war jedoch vergleichsweise geringer, wobei auch hier lediglich ein Trend ohne Erreichen einer Signifikanz vorlag. Die vergleichsweise geringere Abnahme könnte damit erklärt werden, dass bereits vor der ersten Messung eine Abnahme der Corneadicke erfolgte, welche somit nicht im Trendwert der Corneadickenveränderung enthalten ist. Trotz geringerem Abfall der Corneadicke kann somit eine vermehrte Austrocknung der Cornea bei alleiniger Natriumchloridbehandlung vermutet werden. Dies könnte mit der vor allem zu Beginn schwerwiegenderen Kataraktformation zusammenhängen.

Infolge der veränderten Corneaoberflächenbedingungen resultiert ein neues Gleichgewicht zwischen dem Ionen-/Flüssigkeitsaustausch der epithelialen und endothelialen Corneabarriere. Bei Erreichen dieses Gleichgewichtes oder der maximalen Transportkapazität der Ionen- und Flüssigkeitstransportkanäle folgt schliesslich eine Stagnation der Corneadicke. Dies könnte erklären, warum die Corneadickenabnahme limitiert ist und warum beim Vergleich der Abnahme der Corneadicke der jeweiligen Gruppen keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

### **Zusammenhänge der Unterschiede der Kataraktformation und der Pupillenweite**

Trotz identischer Applikation der Mydriatika konnte in der Hypromellose-Natriumchloridlösung-behandelten Gruppe vergleichsweise zur Natriumhyaluronat- oder Natriumchloridlösung-behandelten Gruppe eine signifikant kleinere Pupillendilatation beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine gesteigerte transcorneale Diffusion der Reste des applizierten Tropicamids infolge der Natriumhyaluronat-Applikation darstellen, wie sie von Camber et al (124) für verschiedene Substanzen bereits nachgewiesen wurde. Alternativ könnte der Grundstoff der Hypromellose, die Methycellulose, eine Komplexierung der Tropicamidreste und somit eine geringere Mydriasis infolge der Hypromellose-Applikation bewirken. Eine solche Interaktion wurde für verschiedene pharmazeutische Stoffe nachgewiesen (125).

Ob diese Mechanismen auch im Zusammenhang mit dem Mydriatikum Tropicamid auftreten, kann allerdings anhand dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Zudem verbleiben infolge der Abnahme der Mydriatikareste per Wattetupfer (siehe 3.2.2) nur sehr geringe Rückstände, weshalb fraglich ist ob deren Beeinflussung eine Auswirkung auf die Mydrasis nachsichzieht.

Hinweise auf einen direkten Zusammenhang der Mydriatika mit der Katarakt konnten aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht gefunden werden. Insbesonders da mit gesteigerter Mydriasis sowohl eine mildere, als auch eine schwerwiegendere Kataraktformation der Natriumhyaluronat beziehungsweise Natriumchlorid-applizierten Versuchsgruppe festzustellen war.

Infolge der variierenden Applikationsmethode wurde kein signifikanter Unterschied der Pupillendilatation festgestellt.

**5.2.2.2. Versuchsteil 2**

Weder bei Applikation unterschiedlicher Mydriatika, noch infolge verschiedener Anästhesieprotokolle wurden signifikante Unterschiede der Kataraktformation verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt.

Die BALB/c Mäuse lassen statistisch signifikant eine vergleichsweise schwerwiegendere Kataraktformation der AUC-Werte der SHB, IRB und der Kataraktgrade erkennen. Mit Ausnahme des frühesten Erreichens von Schweregrad 3 zeigen die restlichen Parameter einen Trend zur progressiveren Kataraktformation der BALB/c Tiere, jedoch ohne Erreichen statistischer Signifikanz.

Eine verbesserte Wärmezufuhr zeigte die eindeutigsten Unterschiede des zweiten Versuchsteils in Form einer höheren Körpertemperatur und einer gleichzeitig signifikant schwerwiegenderen Kataraktformation im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Lediglich der durchschnittliche Zeitpunkt des Erreichens von Grad 3 der Katarakt konnte keine signifikanten Unterschiede aufzeigen.

**Diskussion potentiell ursächlicher Faktoren der unterschiedlichen Kataraktformation der jeweiligen Gruppen**

Die schwerwiegendere Kataraktformation der BALB/c Mäuse und der Gruppe mit verbesserter externer Wärmezufuhr in Form des zusätzlichen Temperaturmanagementsystems (=TMS) kann trotz identischer Befeuchtungsprotokolle anhand von Unterschieden der Corneahydratation erklärt werden:

So wurde in den BALB/c Mäusen ein geringerer Flüssigkeitsfilm auf der Corneaoberfläche festgestellt. Eine Erklärung hierfür konnte infolge der praktischen Versuchsdurchführung - mit identischer Applikation befeuchtender Substanzen auf die Corneaoberfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe - nicht gefunden werden. Dennoch führt die vergleichsweise vermehrte Luftexposition der Corneaoberfläche der BALB/c Mäuse vermutlich zu einer stärkeren Dehydratation des Corneagewebes, wie bereits im vorherigen Kapitel infolge verschiedener Applikationsmethoden beschrieben. Dies wiederum bedingt wahrscheinlich einen vermehrten transcornealen Flüssigkeitsverlust und die gravierendere Volumenabnahme des Kammerwassers, sowie die vergleichsweise tendentiell stärkere Abnahme des Linsengewebes und die schwerwiegendere Kataraktformation.

Aufgrund einer stammbedingt vergleichsweise grösseren Corneaoberfläche der BALB/c Mäuse (126), ist zudem eine grössere Diffusionskapazität der Cornea gegenüber den C57BL/6J Mäusen denkbar. Luftbedingte oder Substanzbedingte Einflüsse auf die Corneaoberfläche und den Flüssigkeitshaushalt der Cornea könnten sich folglich stärker auf den Flüssigkeitshaushalt des Kammerwassers und der Linse auswirken.

Des Weiteren lassen die in dieser Arbeit durchschnittlich höheren absoluten Werte des Linsendurchmessers und der Corneadicke, sowie die flachere Augenkammer ein verändertes Grössen- beziehungsweise Oberflächen-Volumen-Verhältnis der BALB/c Mäuse gegenüber den C57BL/6J Mäusen vermuten. Infolgedessen könnten geringfügige Veränderungen des vergleichsweise geringeren Kammerwasservolumens der BALB/c Mäuse sich in stärkerem Ausmass auf die Linse auswirken als bei den C57BL/6J Mäusen. Neben Unterschieden der Corneahydratation sind somit vermutlich auch stammbedingte Unterschiede entscheidend für die schwerwiegender Kataraktformation der BALB/c Mäuse.

Die schwerwiegender Kataraktformation im Zusammenhang mit der - infolge des eingesetzten TMS - verbesserten externen Wärmezufuhr und höheren Körpertemperatur der Mäuse, kann vermutlich auf den entstandenen Luftstrom unterhalb der eingesetzten Wärmedecke zurückgeführt werden. Dieser bedingt eine vermehrte Evaporation der Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche. Die vermehrte Evaporation äusserte sich anhand der Beobachtung der vergleichsweise schnelleren Reduktion der Tropfengrösse, hatte jedoch keine Abnahme des Flüssigkeitsfilms auf der Corneaoberfläche zur Folge. Eine gesteigerte Luftexposition der Corneaoberfläche ist somit nicht anzunehmen. Jedoch steigt infolge der vergleichsweise vermehrten Evaporation und Reduktion der Tropfengrösse die Ionenkonzentration und Osmolarität der verbleibenden Flüssigkeit auf der Corneaoberfläche. Vergleichsweise hyperosmolarere Bedingungen führen zu einem vermehrten Flüssigkeitsausstrom aus dem Corneastroma und den Zellen (127), sowie einer Abnahme der Corneadicke (58, 111). Zudem resultiert osmotisch-bedingt ein Verlust des Kammerwasser und eine Abnahme der Kammertiefe (58). Dies wiederum geht gemäss der unter 5.2.1 beschriebenen Hypothese - eines Zusammenhangs des Kammerwasservolumens mit der Kammerwasserosmolarität und folglich der Dehydratation des Linsengewebes - mit einer schwerwiegenderen Kataraktformation einher.

Des Weiteren kann die Körpertemperatur der Tiere als Ursache der Unterschiede der Kataraktformation in Betracht gezogen werden. Entgegen der bisherigen Literatur, welche eine schwerwiegendere Katarakt bei tieferen Umgebungs- und Körpertemperaturen vermutet (8, 64, 68), konnte in dieser Arbeit eine schwerwiegendere Katarakt infolge einer höheren Körpertemperatur nach Verwendung einer verbesserten externen Wärmezufuhr (= zusätzliches TMS) festgestellt werden. Die Körpertemperatur der BALB/c Gruppe war vergleichsweise zur Kontrollgruppe ebenfalls geringfügig höher. Die Pathogenesetheorie der kalten Katarakt kann folglich auch im zweiten Versuchsteil nicht bestätigt werden.

Unter Annahme eines primären Einflusses der osmotischen anstelle der temperaturbedingten Pathogenese kann dieser Widerspruch zur bisherigen Literatur infolge der beschriebenen erhöhten Luftzirkulation und Evaporation nach Einsatz des TMS, sowie dem geringeren Flüssigkeitsfilm der Corneaoberfläche der BALB/c Mäuse erklärt werden. Inwiefern die beobachteten Unterschiede der Kataraktformation mit der vergleichsweise erhöhten Körpertemperatur oder der erhöhten Evaporation beziehungsweise dem geringeren Flüssigkeitsfilm zusammenhängen, kann anhand dieser Arbeit allerdings nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Die vermehrten Schwankungen der Körpertemperatur bei Verwendung des TMS konnten mit der Durchführung der ophthalmologischen Untersuchungen in Verbindung gebracht werden: Das Stagnieren des Anstiegs der Körpertemperatur fällt mit kurzer Verzögerung unmittelbar in/nach die Zeitspanne der ophthalmologischen Untersuchung, für welche die Tiere unter der Wärmedecke des Systems hervorgeholt wurden. Hinweise auf mögliche Auswirkungen solcher Schwankungen auf die Kataraktformation bestehen nicht.

Aufgrund des nahezu identischen Flüssigkeitsfilms auf der Corneaoberfläche, dem Fehlen von stamm- oder umgebungsbedingten Unterschieden und einer nur geringfügig höheren Körpertemperatur waren infolge der variierenden Anästhesie- und Mydriatikumprotokolle keine Unterschiede der Kataraktformation gegenüber der Kontrollgruppe zu erwarten und wurden auch nicht festgestellt.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und des Linsendurchmessers**

Auch in den Gruppen des zweiten Versuchsteils konnte mit Zunahme der Kataraktformation eine Abnahme des Linsendurchmessers beobachtet werden (Tabelle 31 Anhang 5.2). Die Unterschiede des Linsendurchmessers zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch zu gering, um im Zusammenhang mit der Kataraktformation mit den verwendeten Tierzahlen diesbezüglich eine Aussage treffen zu können.

Auffallend sind die vergleichsweise höheren Linsendurchmesser der BALB/c Mäuse. Da dies bereits beim ersten Messzeitpunkt zu erkennen ist, sind wahrscheinlich stammbedingte Unterschiede ursächlich. Puk et al (128) konnten anhand einer Messung via optischer niederkohärenter Interferometrie keine Unterschiede des Linsendurchmessers zwischen BALB/c und C57BL/6J Mäusen nachweisen. Dieser Widerspruch mit dem in der vorliegenden Arbeit via OCT-Ausmessung bestimmten Linsendurchmesser könnte infolge der unterschiedlichen Messtechnik entstanden sein.

Der vergleichsweise grössere Linsendurchmesser der BALB/c Mäuse könnte durch die veränderten Größenverhältnisse - wie bereits im vorhergehenden Abschnitt diskutiert - zur schwerwiegenderen Kataraktformation der BALB/c Mäuse beitragen.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und der Augenkammertiefe**

Wie bereits im ersten Versuchsteil wird neben dem statistisch ausgewerteten Trendwert, der Durchschnittswert sowie der Verlauf zu einzelnen Messzeitpunkten in die Auswertung miteinbezogen.

Einhergehend mit einer schwerwiegenderen Kataraktformation zeigten die BALB/c Mäuse, sowie die Gruppe mit verbesserter externer Wärmezufuhr und höherer Körpertemperatur - wie infolge der unter 5.2.1 diskutierten Entstehungstheorie der Katarakt erwartetet - eine signifikant stärkere Abnahme der Augenkammertiefe. Zudem konnte ein geringerer Durchschnittswert während der gesamten Anästhesie und zu einzelnen Messzeitpunkten dieser Gruppen festgestellt werden.

Auffallend ist zudem die bereits zum ersten Messzeitpunkt flachere Augenkammer bei den BALB/c Tieren (siehe Abbildung 46), was vermutlich stammbedingt verursacht sein könnte.

Infolge der zusätzlichen Atropinapplikation und der Variation der Anästhesieprotokolle konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten

Unterschiede der Abnahme der Augenkammertiefe beobachtet werden. Die geringfügig höheren Durchschnittswerte – sowohl über den gesamten Anästhesieverlauf, als auch zu den einzelnen Messzeitpunkten – könnten auf tierindividuellen Unterschieden beruhen. Das Fehlen versuchsbedingter Unterschiede bestätigt somit den Zusammenhang zu den fehlenden Unterschieden der Kataraktformation.

### **Zusammenfassung der Unterschiede der Kataraktformation und der Corneadicke**

Bei den BALB/c Mäusen wurde neben einem geringeren Flüssigkeitsfilm auf der Corneaoberfläche eine zu Beginn der Anästhesie gesteigerte Abnahme der Corneadicke festgestellt (Abbildung 45). Dass die Corneadickenabnahme bei zunehmender Anästhesiedauer bei einem bestimmten Wert stagniert, könnte anhand eines limitierenden Gleichgewichtes des bestehenden osmotisch-bedingten Flüssigkeitseinstroms aus dem Kammerwasser mit einem dehydratationsbedingtem Flüssigkeitsausstrom erklärt werden. Eine solche Limitation kann erklären, weshalb die unterschiedliche Corneadickenabnahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine Signifikanz erreicht. Dennoch kann anhand der - vor allem zu Beginn der Anästhesie feststellten - Abnahme der Corneadicke der BALB/c Gruppe ein Zusammenhang des Flüssigkeitshaushaltes der Cornea mit der schwerwiegender verlaufenden Kataraktformation vermutet werden.

Dieselben Prozesse könnten auch das Stagnieren der Corneadickenabnahme und das Fehlen signifikanter Unterschiede der Abnahme der Corneadicke infolge der verbesserten externen Wärmezufuhr gegenüber der Kontrollgruppe erklären.

Auffallend sind zudem höhere Durchschnittswerte der Corneadicke der BALB/c Tiere zu allen Messzeitpunkten, welche vermutlich auf stammbedingte Unterschiede zurückzuführen sind (129).

Analog zu den fehlenden Unterschieden bezüglich der Kataraktentwicklung infolge der Applikation verschiedener Mydriatika oder Anästhesieprotokolle zeigte die Abnahme der Corneadicke keine Unterschiede dieser beiden Gruppen.

### **Zusammenhänge der Unterschiede der Kataraktformation und der Pupillendilatation**

Bei zusätzlicher Atropinapplikation und der Verwendung von BALB/c Mäusen

wurden statistisch signifikant durchschnittlich weiter dilatierte Pupillen nachgewiesen. Ursächlich für die gesteigerte Mydriasis kann das zusätzlich applizierte Mydriatikum sowie stammbedingte Unterschiede der BALB/c Mäuse sein:

Infolge der zusätzlichen Atropinapplikation ist eine vergleichweise vermehrte Besetzung von muskarinen Acetylcholinrezeptoren denkbar, was folglich zu einer gesteigerten Mydriasis führen kann.

Stammbedingt sind physiologische Unterschiede der Anatomie beziehungsweise Morphologie des Auges, sowie pigmentbedingte Einflüsse als Ursache für die durchschnittlich weiteren Pupillen der BALB/c Mäuse denkbar.

Unter Einsatz der verbesserten externen Wärmezufuhr und des Xylazin-Ketamin-Protokolls resultierten keine signifikanten Unterschiede der durchschnittlichen Pupillenweite.

Ein Zusammenhang der Pupillendilatation mit den Unterschieden der Kataraktformation konnte basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Jedoch zeigt die Auswertung dieser Ergebnisse, dass die Pupillendilatation nicht nur anhand der Applikation zusätzlicher Mydriatika, sondern auch stammbedingt beeinflusst sein könnte.

#### **5.2.2.3. Geschlechtsbedingter Einfluss**

Ein geschlechtsbedingter Einfluss auf die Katarakt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt die *in vitro* aufgestellte Hypothese von Li et al (73), dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Formation der Katarakt hat. Das Fehlen geschlechtsbedingter Unterschiede erscheint nachvollziehbar, da keine Hinweise auf eine hormonelle oder andersweitig geschlechtsbedingte Komponente bei der Kataraktätiologie oder -pathogenese bestehen.

#### **5.2.3. Reversibilität der Katarakt**

Eine Reversibilität der Katarakt konnte in allen Versuchsgruppen dieser Arbeit beobachtet werden.

Ein regulatorischer Volumenanstieg der zuvor im Zuge der Dehydratation des Linsengewebes geschrumpften Zellen erklärt die Reversibilität der Katarakt: Infolge des Volumenverlustes resultiert eine Aktivierung verschiedener, membranständiger Transportkanäle und eine sekundäre Erhöhung der Ionenkonzentration im Inneren der Zelle (127). Dies ermöglicht über einen

osmotischen Wassereinstrom das Zellvolumen des Linsengewebes wiederherzustellen (97, 130). Das Erreichen des ursprünglichen Zellvolumens gewährleistet schlussendlich die Transparenz der Linse (siehe 2.1.2) und folglich die Reversibilität der Katarakt. Der beobachtete Verlauf der Kataraktrückentwicklung – entsprechend der Entwicklungsrichtung – unterstützt diese These, da ein regulatorischer Volumenanstieg der Zellen zeitlich versetzt in selber Richtung wie die Dehydratation zu vermuten ist.

Dass die Reversibilität im Zusammenhang mit der Katarakt anästhesierter Mäuse zu beobachten ist, jedoch nicht infolge anderen Kataraktformen, könnte wie folgt erklärt werden: Während die Dehydratation des Linsengewebes infolge des regulatorischen Volumenanstiegs und der begrenzten Dauer der Anästhesie limitiert ist, geht ein Flüssigkeitseinstrom und eine Zellschwellung wie er im Zusammenhang mit anderen Kataraktformen beschrieben ist (25, 82) trotz regulatorischer Volumenabnahme der Zellen (131) häufig mit einer Zerstörung der Linsenepithelzellschicht und der Zell-/Fasermembran (25) sowie einer irreversiblen Fragmentation und Degeneration der Fasern einher (35). Solche Veränderungen wurden bei der histologischen Untersuchung der Katarakt anästhesierter Mäuse weder in dieser Arbeit, noch in der vorliegenden Literatur (4, 7) beobachtet (siehe folgendes Kapitel).

### 5.2.3.1. Histologische Untersuchung

Aufgrund der widersprüchlichen Aussagen zweier Studien (4, 7) bezüglich der mikroskopischen Befunde der Katarakt im Rahmen histopathologischer Untersuchungen (siehe Kapitel 2.3.7) wurde eine solche Untersuchung in der vorliegenden Arbeit erneut durchgeführt.

Die histologische Untersuchung zeigte keine variierenden Befunde zwischen den unmittelbar bei Beenden der Anästhesie entnommenen, getrübten Linsen und den nach 22-26 Stunden entnommenen, per Spaltlampenbeleuchtung als transparent bewerteten Linsen. Eine mögliche Erklärung stellt eine postmortale Beeinflussung des Linsengewebes im Zusammenhang mit der Herstellung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Linsenschnitte dar: So wird beispielsweise vor Einbettung der Proben in Paraffinblöcke eine Entwässerung der Gewebeproben mit aufsteigender Alkoholreihe (132), nach dem Schneiden der Proben eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (133) durchgeführt. Dies könnte den Hydratationsstatus des Linsengewebes beider Gruppen insofern beeinflussen, dass zuvor

versuchsbedingte Unterschiede nicht mehr erkennbar sind.

Eine Vakuolisierung, wie sie fokal anterior der germinativen Zone zwischen den Linsenfasern aller Linsen beobachtet wurde, kann hinweisend für eine Kataraktformation sein (35) (siehe Kapitel 2.2.2). Da diese Befunde jedoch nicht im Einklang mit der - per Spaltlampenuntersuchung diagnostizierten - Lokalisation der diffus anterior-kortikalen Katarakt stehen und trotz unterschiedlicher Kataraktformation zum Entnahmzeitpunkt in beiden Gruppen im selben Ausmass festgestellt wurden, wird angenommen, dass es sich nicht um eine Kataraktbedingte Veränderung handelt. Stattdessen wird die Vakuolisierung als verarbeitungsbedingtes Artefakt in Folge der Fixierung oder des Zuschnitts des Gewebes (54, 134) interpretiert.

Dass im Rahmen dieser Arbeit die von Li et al (4) beobachteten Veränderungen in Form einer unregelmässigen Dicke und Anordnung der Linsenfasern nicht beobachtet werden konnten, könnte durch die unterschiedliche postmortale Aufbewahrung bedingt sein: Li et al (4) bewahrten die entnommenen Augen bei 4 Grad Umgebungstemperatur auf, einer Temperatur infolgederer weitere Studien *in vitro* kältebedingte Veränderungen der Linse nachweisen konnten (68, 73). Im Gegensatz dazu wurden die Linsen dieser Arbeit bei Raumtemperatur aufbewahrt. Diese Unterschiede könnten aufgrund möglicher kältebedingter Einflüsse (68, 73) die widersprüchlichen Ergebnisse der histologischen Untersuchung erklären.

Weitere Anzeichen einer Katarakt wie sie in der Literatur (siehe Kapitel 2.2.2) beschrieben sind, konnten in keiner der beiden Gruppen festgestellt werden.

#### **5.2.4. Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen nach Beenden der Anästhesie**

Die Rückentwicklung der Katarakt konnte in Gruppe 1 aufgrund der unmittelbar an die Anästhesie anschliessenden Euthanasie zur histologischen Untersuchung der Katarakt nicht untersucht werden.

Signifikante Unterschiede der Rückentwicklung infolge der variierenden Befeuchtungsprotokolle, applizierten Hydratika oder des Einsatzes eines TMS konnten nicht festgestellt werden (Tabelle 29 Anhang 4).

Die Beobachtung einer vergleichsweise verlängerten und erschwerten Erholungsphase nach Beenden der teilweise antagonisierten Xylazin-Ketamin-Anästhesie gegenüber der vollständig antagonisierten MMF-Anästhesie erklärt die

gleichzeitig signifikant langsamere Rückentwicklung der Katarakt: Neben der Muskelkoordination treten bei vollständiger Antagonisierung des Anästhesieprotokolls auch Reflexe früher wieder ein (62). Eine früher wiederhergestellter Blinzelreflex hat eine bessere Verteilung der Tränenflüssigkeit auf der Corneaoberfläche und eine schnellere Wiederherstellung des physiologischen Tränenfilms sowie dem physiologischen Flüssigkeitshaushalt der Cornea, der Augenkammer und der Linse zur Folge. Unter Annahme der Osmolaritätstheorie als primäre Pathogenesetheorie ist daher eine vergleichsweise langsamere Kataraktrückentwicklung infolge der Xylazin-Ketamin-Anästhesie gegenüber der in dieser Arbeit erstmals eingesetzten MMF-Anästhesie nachvollziehbar. Mit gruppenübergreifend durchschnittlich 106.56 Minuten bis zur vollständigen Wiederherstellung der Transparenz war dies innerhalb der in der Literatur angegebenen Zeitspanne (siehe 2.3.5). Jedoch wurde in der Literatur überwiegend von einer Dauer über mehrere Stunden berichtet (3, 4, 8, 81). Der überwiegende Einsatz des MMF-Anästhesieprotokolls in dieser Arbeit könnte die tendentiell schnell verlaufende Reversibilität der Katarakt im Vergleich zu bisherigen Studien erklären, welche nicht vollständig antagonisierbare Anästhesieprotokolle verwendeten (siehe 2.3.3).

Eine mögliche Ursache für die schnellere Rückentwicklung der Katarakt in den BALB/c Mäusen könnten die in dieser Arbeit festgestellten variierenden Größenverhältnisse des Auges darstellen. Infolge der verhältnismässig flacheren Augenkammer und dem folglich kleineren Kammerwasservolumen könnte die physiologische Kammerwasserosmolarität schneller wiederhergestellt und der Einfluss auf das Linsengewebe schneller aufgehoben werden.

### 5.2.5. Korrelation der Ergebnisse

#### Untersuchungs-/Auswertungsmethoden

Die positive Korrelation der Befunde der Spaltlampen- und OCT-Untersuchung und der erhobenen Parameter Kataraktgrad, AKfB, SHB und IRB verdeutlicht, dass jeder dieser Parameter ergänzend für die Detektion von Unterschieden der Kataraktformation geeignet ist.

Aufgrund der in dieser Arbeit erstmals durchgeföhrten quantitativen Beurteilung, war die Überprüfung einer Korrelation der Befunde mit den semiquantitativen Ergebnissen der Spaltlampenuntersuchung notwendig.

### **Korrelation Linsendurchmesser/Augenkammertiefe/Corneadicke und SHB**

Die teilweise signifikant, teilweise tendentiell festgestellte Korrelation des abnehmenden Linsendurchmessers, der Abnahme der Augenkammertiefe (aller Gruppen mit Ausnahme der Natriumchloridlösung applizierte Gruppe 2b (OS)) und der Corneadickenabnahme mit Zunahme der SHB - sprich der Kataraktformation - unterstützt die These eines Zusammenhangs mit der Kataraktformation. Dass in der Natriumchloridlösung applizierte Gruppe eine nicht signifikant widersprüchliche Korrelation der Augenkammertiefe mit der SHB vorliegt, ist vermutlich aufgrund der in dieser Gruppe geringeren Tierzahl begründet und kann nicht als aussagekräftig gewertet werden.

### **Korrelation Mydriasis und SHB**

Ein Zusammenhang der Mydriasis und der SHB konnte nur in der Xylazin-Ketamin-anästhesierten Gruppe, sowie bei den BALB/c Mäusen signifikant gezeigt werden. Eine Erklärung für die gegensätzlich positive und negative Korrelation der Pupillenweite mit zunehmender SHB in diesen Gruppen konnte nicht gefunden werden. Aufgrund der widersprüchlichen Korrelation beider Gruppen und dem Fehlen einer Korrelation in den restlichen Versuchsgruppen wird kein Zusammenhang der Pupillenweite mit der Kataraktformation vermutet.

#### **5.2.6. Betroffene Spezies**

Als mögliche Ursache für das erfahrungsgemäss hochfrequente Auftreten dieser Kataraktform bei der Maus und dem Fehlen eines solchen Phänomens bei Spezies wie dem Menschen, könnten die besonderen Größenverhältnisse des Mausauge (siehe Kapitel 2.3.1) denkbar sein: Infolge der vergleichsweise kleineren Augenkammer der Spezies Maus könnte eine Abnahme des Kammerwasservolumens zu einer gravierenderen Erhöhung der relativen Ionenkonzentration beitragen. Das Erreichen eines kritischen Schwellwertes der Kammerwasserosmolarität wiederum könnte sich in Form einer Kataraktformation äussern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Corneadurchmesser der Maus einen doppelt so grossen Anteil des Auges ausmacht als dies beim menschlichen Auge der Fall ist (123). Ausgehend von einem transcornealen Flüssigkeitsverlust als Ursache der Katarakt, wie er in bisherigen Studien (1-3, 7, 67) und im Rahmen dieser Arbeit vermutet wird, kann dies eine erhöhte Prädisposition der Spezies Maus gegenüber Spezies wie dem Menschen erklären.

## **6. Zusammenfassung**

### **Formation einer Katarakt bei Mäusen unter Allgemeinanästhesie: Untersuchung von Einflussfaktoren und möglichen Präventionsmethoden**

#### Ziel:

Das Ziel dieser Arbeit war es, beeinflussende Faktoren und möglicherweise präventive Massnahmen der Kataraktformation anästhesierter Mäuse vergleichend zu untersuchen.

#### Methodik:

98 Mäuse wurden für jeweils eine Stunde anästhetisiert und die Kataraktformation per Spaltlampenuntersuchung und Swept-Source optischer Kohärenztomographie (=SS-OCT) untersucht. In verschiedenen Versuchsgruppen wurde jeweils einer der folgenden Faktoren variiert: Das Corneabefeuchtungsprotokoll (Applikationsmethode per Pipette oder Feindosierungsspritze; Einsatz verschiedener Substanzen (Hypromellose- und Natriumchloridlösung oder Natriumhyaluronat-Augengel oder alleiniger Natriumchloridlösung)), die Mydriatika (Tropicamid oder Tropicamid-Atropin-Kombination), das Anästhesieprotokoll (Medetomidin-Midazolam-Fentanyl (=MMF) oder Xylazin-Ketamin), der Mausstamm (C57BL/6J oder BALB/c) sowie die externe Wärmezufuhr (mit oder ohne zusätzlichem Temperaturmanagementsystem (=TMS) neben einer elektrischen Wärmematte). Jene C57BL/6J Versuchsgruppe mit topikaler Corneabefeuchtung in Form einer einmaligen Hypromellose- sowie wiederholt per Pipette aufgetragener Natriumchloridlösung, einer Verabreichung von Tropicamid, MMF-Anästhesie und ohne zusätzlichem TMS diente als Kontrollgruppe.

Bewertet wurden bezüglich der Kataraktformation der Schweregrad und die prozentuale Ausdehnung der Trübung bei frontaler Betrachtung per Spaltlampe (=AKfB) sowie quantitativ die Grösse hyperreflektiver Bereiche auf den OCT B-Scans. Zudem erfolgte auf den B-Scans eine quantitative Ausmessung des Linsendurchmessers, der Augenkammertiefe, der Corneadicke, des Flüssigkeitsfilms auf der Corneaoberfläche und der Pupillenweite. Zudem wurde die Körpertemperatur der Mäuse kontinuierlich überwacht und dokumentiert. Nach Beenden der Anästhesie wurden die Linsen entweder unmittelbar oder nach 22-26 Stunden infolge einer Untersuchung der Rückentwicklung der Katarakt entnommen und eine histologische Untersuchung durchgeführt.

#### Ergebnisse:

Variationen des Corneabefeuchtungsprotokolls äusserten sich in signifikanten Unterschieden der Kataraktformation: Die Verwendung einer Pipette und wiederholte Applikation des Natriumhyaluronat-Augengels resultierte in einer milderer Kataraktformation gegenüber dem Einsatz einer Feindosierungsspritze oder des Hypromellose-/Natriumchloridlösung-Protokolls. Die alleinige, wiederholte Applikation von Natriumchloridlösung auf die Corneaoberfläche hingegen zeigte eine vergleichsweise schwerwiegendere Kataraktformation gegenüber der Verwendung des Hypromellose-/Natriumchloridlösung-Protokolls. Des Weiteren konnte bei den BALB/c Mäusen, sowie bei höherer Körpertemperatur infolge des verwendeten TMS eine signifikant schwerwiegendere Kataraktformation festgestellt werden. Eine Beeinflussung der Katarakt während der Anästhesie infolge verschiedener Mydratika oder Anästhesieprotokolle konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Eine schwerwiegendere Kataraktformation ging mit einer signifikant gravierenderen Abnahme der Augenkammertiefe einher. Zudem konnte mit schwerwiegenderer Kataraktformation eine tendentiell stärkere Abnahme der Corneadicke und des Linsendurchmessers beobachtet werden.

Einzig infolge des Natriumhyaluronat-Augengels wurden während der Anästhesie Komplikationen in Form von Corneaödemen festgestellt.

In allen Versuchsgruppen wurde eine vollständige Reversibilität der Katarakt beobachtet. Infolge des Anästhesieprotokolls Xylazin-Ketamin wurde eine signifikant langsamere Rückentwicklung gegenüber der Verwendung des MMF-Protokolls und nach Einsatz von BALB/c Mäusen eine signifikant schnellere Rückentwicklung verglichen mit den C57BL/6J festgestellt.

#### Schlussfolgerung:

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wird der Einsatz des Natriumhyaluronat-Augengels zur Corneabefeuchtung, sowie die Verwendung einer Pipette zur Kataraktreduktion empfohlen. Allerdings wurde im Zusammenhang mit der Natriumhyaluronatapplikation die Entwicklung eines Corneaödemes beobachtet. Aufgrund dieses Nachteils ist das Natriumhyaluronat-Protokoll für ophthalmologische Studien auch nicht optimal. Bei der Planung von Studien müssen zudem stammspezifische Unterschiede berücksichtigt werden.

Trotz fehlender Unterschiede während der Kataraktformation ist aufgrund der schnelleren Reversibilität der Katarakt der Einsatz des MMF-Anästhesieprotokolls anstelle des Xylazin-Ketamin-Protokolls empfehlenswert. Die Verwendung

verschiedener Mydriatika lässt kein zu bevorzugendes Protokoll erkennen.

Da bei Verwendung eines TMS gegenüber einer alleinigen elektrischen Wärmematte eine verbesserte externe Wärmezufuhr durch eine höhere Körpertemperatur aber auch eine schwerwiegendere Kataraktformation beobachtet werden konnte, ist dessen zusätzlicher Einsatz zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, jedoch nicht bezüglich der Kataraktformation ratsam.

Eine wiederholte Beurteilung der Formation einer reversiblen Katarakt wird während und nach der Durchführung ophthalmologischer Studien mit anästhesierten Mäusen dringend empfohlen, um kataraktbedingte Effekte auf Studiendaten bestimmen und von andersweitigen Befunden abgrenzen zu können.



## 7. Summary

### **Formation of cataract in laboratory mice under anesthesia: investigation of influencing factors and possible prevention methods**

#### Purpose:

To compare influencing factors and possible preventive methods on cataract formation in anesthetized mice.

#### Methods:

A total of 98 mice were anesthetized for one hour and cataract formation was monitored by slit lamp examination and swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). Different experimental groups varied by one of the following parameters:

The corneal lubrication protocol (application method and use of different substances (hypromellose- and sodiumchloride-solution versus sodiumhyaluronate ophthalmic gel versus sodiumchloride-solution)), the type of mydriatics used (tropicamide versus tropicamide-atropine combination), the anesthesia protocol (medetomidine-midazolam-fentanyl (=MMF) versus xylazine-ketamine), mouse strain (C57BL/6J versus BALB/c), as well as external heat supply (with or without additional temperature-management-system (=TMS) to electric heating pad).

Incidence and severity of cataract formation were assessed by slit lamp biomicroscopy as well as optical coherence tomography (OCT).

In addition, ocular parameters such as lens diameter, anterior chamber depth, corneal thickness, fluid amount on corneal surface and pupil size were assessed.

Histopathologic examinations were performed.

#### Results:

The following parameters were shown to significantly impact cataract incidence and severity:

Variations of corneal lubrication protocol resulted in significant alterations of cataract formation. The use of a pipette and sodiumhyaluronate ophthalmic gel to moisten the corneal surface resulted in milder cataract formation compared with the use of a fine-dose-syringe or hypromellose/sodiumchloride-solution-protocol. In contrast application of sodiumchloride-solution alone showed a more severe cataract formation compared to the use of hypromellose/sodiumchloride-solution protocol.

Furthermore, a significant more severe cataract formation was observed in BALB/c

compared to C57BL/6 mice, as well as due to a higher body temperature, after additional external heat supply using a TMS to an electric heating pad used as standard in all experimental groups. An influence on cataract formation due to different mydratics and anesthetic protocols was not observed in this study.

A more severe cataract formation was associated with a significant more severe decrease of anterior chamber depth. In addition, a tendentially greater decrease of corneal thickness and lens diameter was observed with more severe cataract formation. It should be noted, that corneal edema occurred as a result of sodiumhyaluronate ophthalmic gel application.

All cataracts observed were fully reversible. A significantly slower regression was detected after using the xylazine-ketamine anesthetic protocol compared to the MMF protocol and a significantly faster regression after using BALB/c instead of C57BL/6J mice.

#### **Conclusion:**

Based on the results of this work the use of sodiumhyaluronate ophthalmic gel, as well as the use of a pipette for corneal lubrication is recommended in context of cataract reduction. However, corneal edema was observed with sodium hyaluronate application. Because of this disadvantage, the sodium hyaluronate protocol is also suboptimal for ophthalmic studies. In addition strain-specific differences must be taken into account when planning studies.

Although there is no difference of cataract formation during anesthesia, the use of MMF anesthesia rather than xylazine-ketamine is recommended due to the faster reversibility of the cataract. The use of different mydratics does not indicate a protocol to be preferred.

Since a higher body temperature but also a more severe cataract formation was observed when using a refined external heat supply by additional TMS compared with the electrical heating pad alone, its additional use is advisable only for the maintenance of body temperature but not regarding cataract formation. Repeated assessment of reversible cataract formation is strongly recommended during and after performance of ophthalmologic studies with anesthetized mice to determine and distinguish cataract-related effects on study data from other findings.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ridder Iii WH, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Causes of Cataract Development in Anesthetized Mice. *Experimental Eye Research.* 2002;75(3):365-70.
2. Calderone L, Grimes P, Shalev M. Acute reversible cataract induced by xylazine and by ketamine-xylazine anesthesia in rats and mice. *Experimental Eye Research.* 1986;42(4):331-7.
3. Tkatchenko TV, Tkatchenko AV. Ketamine–xylazine anesthesia causes hyperopic refractive shift in mice. *Journal of Neuroscience Methods.* 2010;193(1):67-71.
4. Li XT, Qin Y, Zhao JY, Zhang JS. Acute lens opacity induced by different kinds of anesthetic drugs in mice. *Int J Ophthalmol.* 2019;12(6):904-8.
5. Li CR, Sun SG, Rahman IA, Lai CM. Acute reversible lens opacity affects retinal HRA + OCT imaging in mice. *International Journal of Ophthalmology.* 2010;10(1):21-2.
6. Tam WK, Chan H, Brown B, Yap M. Effects of different degrees of cataract on the multifocal electroretinogram. *Eye.* 2004;18(7):691-6.
7. Fraunfelder FT, Burns RP. Acute reversible lens opacity: caused by drugs, cold, anoxia, asphyxia, stress, death and dehydration. *Exp Eye Res.* 1970;10(1):19-30.
8. Bermudez MA, Vicente AF, Romero MC, Arcos MD, Abalo JM, Gonzalez F. Time course of cold cataract development in anesthetized mice. *Current Eye Research.* 2011;36(3):278-84.
9. Gu Y, Xu B, Feng C, Ni Y, Hong N, Wang J, et al. Topical Use of NaCl Solution with Different Concentration Affects Lens Transparency in Anesthetized

Mice. Curr Eye Res. 2016;41(7):943-50.

10. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique: Methuen; 1959.
11. Lens A, Nemeth SC, Ledford JK. Ocular Anatomy and Physiology: SLACK; 2008.
12. Beebe DC. The lens. In: Levin Leonard A. NSFE, Ver Hoeve James, Wu Samuel M., Adler Francis Heed, editor. Adler's physiology of the eye. 11. Edition ed. Edingburg: Saunders/Elsevier; 2011. p. 131-81.
13. Smith R, John S, Nishina P, Sundberg J, editors. Systematic Evaluation of the Mouse Eye : Anatomy, Pathology, and Biomethods2001.
14. Vézina M. Comparative Ocular Anatomy in Commonly Used Laboratory Animals. In: Weir AB, Collins M, editors. Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 1-21.
15. Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology2018.
16. BioRender.com. 2021 [updated 2021].
17. Paint 3D - App. Microsoft Corporation; 2/17/2016.
18. Bassnett S. On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens. Experimental eye research. 2009;88(2):133-9.
19. Hejtmancik JF, Riazuddin SA, McGreal R, Liu W, Cvekl A, Shiels A. Lens Biology and Biochemistry. Progress in molecular biology and translational science. 2015;134:169-201.

20. Bassnett S, Šikić H. The lens growth process. Progress in retinal and eye research. 2017;60:181-200.
21. Zeiss CJ, Tu DC, Phan I, Wong R, Treuting PM. 21 - Special Senses: Eye. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. Comparative Anatomy and Histology (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2018. p. 445-70.
22. Gum GG, MacKay OE. Physiology of the eye. In: J GKNGBCKT, editor. Veterinary ophthalmology: Two volume set. 5. Edition ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. p. 171-207.
23. Brady JP, Garland D, Duglas-Tabor Y, Robison WG, Jr., Groome A, Wawrousek EF. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(3):884-9.
24. Wistow G, Slingsby C, Blundell T. Eye-lens proteins: The three-dimensional structure of  $\beta$ -crystallin predicted from monomeric  $\gamma$ -crystallin. FEBS Letters. 1981;133(1):9-16.
25. Jacob TJ. The relationship between cataract, cell swelling and volume regulation. Progress in retinal and eye research. 1999;18(2):223-33.
26. Mathias RT, Kistler J, Donaldson P. The Lens Circulation. Journal of Membrane Biology. 2007;216(1):1-16.
27. Wevill M. Epidemiology, Pathophysiology, Causes, Morphology, and Visual Effects of Cataract. In: Yanoff MMD, Duker JSMD, editors. Ophthalmology2019. p. 330-6.e1.
28. Marta Leiva, Peña T. Diseases of the Lens and Cataract Formation. In: Kirk N. Gelatt, Gil Ben-Shlomo, Brian C. Gilger, Diane V.H. Hendrix, Thomas J. Kern,

Plummer CE, editors. Veterinary Ophthalmology. 6. Edition ed2021. p. 1317-71.

29. Kuwabara T, Imaizumi M. Denucleation Process of the Lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1974;13(12):973-81.
30. Rafferty NS, Esson EA. An electron-microscope study of adult mouse lens: Some ultrastructural specializations. *Journal of Ultrastructure Research*. 1974;46(2):239-53.
31. Michael R, van Marle J, Vrensen GF, van den Berg TJ. Changes in the refractive index of lens fibre membranes during maturation--impact on lens transparency. *Exp Eye Res*. 2003;77(1):93-9.
32. Fitch CL, Swedberg SH, Livesey JC. Measurement and manipulation of the partial pressure of oxygen in the rat anterior chamber. *Current Eye Research*. 2000;20(2):121-6.
33. Reddy VN. Glutathione and its function in the lens—An overview. *Experimental Eye Research*. 1990;50(6):771-8.
34. Smith R, John SWM, Nishina PM, Sundberg JP, editors. XXX Systematic Evaluation of the Mouse Eye : Anatomy, Pathology, and Biomethods2001.
35. Weir A, Collins M. Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals2013.
36. Kowa\_Europe\_GmbH. <https://www.kowamedical.com/sl17.html> <https://www.kowamedical.com/sl17.html>: Kowa\_Europe\_GmbH; 2022 [Available from: <https://www.kowamedical.com/sl17.html>].
37. Al-Abdulla NA, Kerrison JB. Use of the Slit Lamp Biomicroscope for Examining Ocular Anatomy and Pathology. *Advanced Emergency Nursing Journal*. 2000;22(4):52-7.

38. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea E-Book: Elsevier Health Sciences; 2010.
39. Davidson MG, Nelms SR. Diseases of the Lens and Cataract Formation. In: Kern KNGBCGTJ, editor. Veterinary Ophthalmology: Two volume set. 5th Edition ed: John Wiley & Sons; 2013. p. 1199-233.
40. Wilkie DA. The Ophthalmic Examination as It Pertains to General Ocular Toxicology: Basic and Advanced Techniques and Species-Associated Findings. In: Gilger BC, editor. Ocular Pharmacology and Toxicology. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 143-203.
41. Marschall S, Sander B, Mogensen M, Jørgensen TM, Andersen PE. Optical coherence tomography—current technology and applications in clinical and biomedical research. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011;400(9):2699-720.
42. Aumann S, Donner S, Fischer J, Müller F. Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. In: Bille JF, editor. High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 59-85.
43. Fujimoto J, Swanson E. The Development, Commercialization, and Impact of Optical Coherence Tomography. Investigative ophthalmology & visual science. 2016;57(9):OCT1-OCT13.
44. Vision T-Ta. Product information CASIA 2 medilas.ch: TOMEY; 2021 [updated 11.2017. Available from: <https://medilas.ch/wp-content/uploads/medilas/products/02.09/Product-Information-CASIA-2-EN.pdf>.
45. Liu JJ, Grulkowski I, Kraus MF, Potsaid B, Lu CD, Baumann B, et al. In vivo imaging of the rodent eye with swept source/Fourier domain OCT. Biomed Opt Express. 2013;4(2):351-63.

46. Eugui P, Harper DJ, Kummer S, Lichtenegger A, Gesperger J, Himmel T, et al. Three-dimensional visualization of opacifications in the murine crystalline lens by *in vivo* optical coherence tomography. *Biomed Opt Express.* 2020;11(4):2085-97.
47. Baumann B, Augustin M, Lichtenegger A, Harper D, Muck M, Eugui P, et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography imaging of the anterior mouse eye. *Journal of Biomedical Optics.* 2018;23(8):086005.
48. Huang D, Wang J, Lin CP, Puliafito CA, Fujimoto JG. Micron-resolution ranging of cornea anterior chamber by optical reflectometry. *Lasers in surgery and medicine.* 1991;11(5):419-25.
49. O'Donnell C, Hartwig A, Radhakrishnan H. Comparison of Central Corneal Thickness and Anterior Chamber Depth Measured Using LenStar LS900, Pentacam, and Visante AS-OCT. *Cornea.* 2012;31(9).
50. Sridhar MS. Advantages of Anterior Segment Optical Coherence Tomography Evaluation of the Kayser–Fleischer Ring in Wilson Disease. *Cornea.* 2017;36(3):343-6.
51. Steinert RF, Huang D. *Anterior Segment Optical Coherence Tomography:* SLACK; 2008.
52. Kraus MF, Potsaid B, Mayer MA, Bock R, Baumann B, Liu JJ, et al. Motion correction in optical coherence tomography volumes on a per A-scan basis using orthogonal scan patterns. *Biomed Opt Express.* 2012;3(6):1182-99.
53. Eugui P, Merkle CW, Gesperger J, Lichtenegger A, Baumann B. Investigation of the scattering and attenuation properties of cataracts formed in mouse eyes with 1060-nm and 1310-nm swept-source optical coherence tomography. *Biomed Opt Express.* 2021;12(10):6391-406.

54. Cogan DG. Anatomy of lens and pathology of cataracts. Experimental Eye Research. 1962;1(4):291-IN3.
55. Newkirk K, Chandler H, Parent A, Young D, Colitz C, Wilkie D, et al. Ultraviolet Radiation-Induced Corneal Degeneration in 129 Mice. Toxicologic pathology. 2007;35:819-26.
56. Gruebel MM. Eye, Lens - Cataract - Nonneoplastic Lesion Atlas National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services [updated 22.10.2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK476171/f>].
57. Vicente Victor Dizon Ocampo JM, Foster CS. Senile Cataract (Age-Related Cataract) Workup2021 26.10.2021. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1210914-workup#c7>.
58. Ni Y, Xu B, Wu L, Du C, Jiang B, Ding Z, et al. Assessment of Full-Eye Response to Osmotic Stress in Mouse Model In Vivo Using Optical Coherence Tomography. Journal of Ophthalmology. 2015;2015:568509.
59. Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JPG. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. Investigative ophthalmology & visual science. 2009;50(8):3648-54.
60. Flecknell P. Laboratory Animal Anaesthesia: Elsevier Science; 2015.
61. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, et al. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. ILAR Journal. 2012;53(1):E55-E69.
62. Fleischmann T, Jirkof P, Henke J, Arras M, Cesarovic N. Injection anaesthesia with fentanyl–midazolam–medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. Laboratory animals. 2016;50(4):264-74.

63. Chatenay-Rivauby C, Bensaoula T, Ryckelynck H, Gérard C, Vidotto N, Ottlecz A, et al. Transient cataract in rodents: an isolated phenomenon induced by ketamine-xylazine? *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(13):354-.
64. Vieira AC, Vicente AF, Perez R, Gonzalez F. Chloral hydrate anesthesia and lens opacification in mice. *Current Eye Research*. 2009;34(5):355-9.
65. Bell BA, Kaul C, Hollyfield JG. A protective eye shield for prevention of media opacities during small animal ocular imaging. *Experimental eye research*. 2014;127:280-7.
66. Ikeda W, Nakatani T, Uemura A. Cataract-preventing contact lens for in vivo imaging of mouse retina. *BioTechniques*. 2018;65(2):101-4.
67. Lee H, Kim HK, Shin HS, Han SJ, Yoon S, Seong JK, et al. Evaluation of factors related to Anaesthesia-induced Lens opacity in experimental mice. *Laboratory Animal Research*. 2020;36(1):1.
68. Li Y, Li Y, Liu X, He Y, Guan T. Protein and Water Distribution Across Visual Axis in Mouse Lens: A Confocal Raman MicroSpectroscopic Study for Cold Cataract. *Front Chem*. 2021;9:767696-.
69. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Veterinary Research*. 2014;10(1):198.
70. Weinstock M, Scott JD. Effect of various agents on drug-induced opacities of the lens. *Experimental Eye Research*. 1967;6(4):368-IN13.
71. Flecknell PA. Chapter 3 - Anaesthetic Management. In: Flecknell PA, editor. *Laboratory Animal Anaesthesia* (Third Edition). San Diego: Academic

Press; 2009. p. 79-108.

72. Gjendal K, Franco NH, Ottesen JL, Sørensen DB, Olsson IAS. Eye, body or tail? Thermography as a measure of stress in mice. *Physiology & Behavior*. 2018;196:135-43.
73. Li Y, Liu X, Xia C-H, FitzGerald PG, Li R, Wang J, et al. CP49 and filensin intermediate filaments are essential for formation of cold cataract. *Mol Vis*. 2020;26:603-12.
74. Tanaka T, Ishimoto C, Chylack Jr LT. Phase separation of a protein water mixture in cold cataract in the young rat lens. *Science*. 1977;197(4307):1010-2.
75. FitzGerald PG. Lens intermediate filaments. *Experimental eye research*. 2009;88(2):165-72.
76. Lerman S, Zigman S. Metabolic studies on the cold precipitable protein of the lens. *Acta Ophthalmologica*. 1967;45:193-9.
77. Siezen RJ, Fisch MR, Slingsby C, Benedek GB. Opacification of gamma-crystallin solutions from calf lens in relation to cold cataract formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(6):1701-5.
78. Lo WK. Visualization of crystallin droplets associated with cold cataract formation in young intact rat lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(24):9926-30.
79. Wang K, Cheng C, Li L, Liu H, Huang Q, Xia C-h, et al.  $\gamma$ D-Crystallin-Associated Protein Aggregation and Lens Fiber Cell Denucleation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(8):3719-28.
80. Zigman S, Lerman S. A Cold Precipitable Protein in the Lens. *Nature*. 1964;203(4945):662-3.

81. Claoué CM. Phenylephrine-induced reversible cataract in the mouse. *J R Soc Med.* 1987;80(11):694-5.
82. Hsuan JD, Brown NA, Bron AJ, Patel CK, Rosen PH. Posterior subcapsular and nuclear cataract after vitrectomy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* 2001;27(3).
83. Trindade F. Transient cataract and hypermetropization in diabetes mellitus: case report. *Arquivos brasileiros de oftalmologia.* 2007;70(6):1037-9.
84. Butler PA. Reversible cataracts in diabetes mellitus. *J Am Optom Assoc.* 1994;65(8):559-63.
85. Jin YY, Huang K, Zou CC, Liang L, Wang XM, Jin J. Reversible cataract as the presenting sign of diabetes mellitus: report of two cases and literature review. *Iran J Pediatr.* 2012;22(1):125-8.
86. Toh TY, Morton J, Coxon J, Elder MJ. Medical treatment of cataract. *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2007;35(7):664-71.
87. Liu YC, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta JS. Cataracts. *Lancet* (London, England). 2017;390(10094):600-12.
88. FRAUNFELDER FT, BURNS RP. Effect of Lid Closure in Drug-Induced Experimental Cataracts: Chlorpromazine, Morphine, and Epinephrine. *Archives of Ophthalmology.* 1966;76(4):599-601.
89. GV-Solas. Recommendations on anaesthesia methodologies for animal experimentation in rodents and rabbits. <http://www.gv-solas.de/index.php?id=33>: Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS  
Supported by the working group 4 of TVT (Kristianna Becker, Heidelberg; Alessandra Bergadano, Basel; Eva Eberspächer, Wien; Jörg Haberstroh, Freiburg; Julia Henke, Biberach; Martin Sager, Düsseldorf; Daniel Zahner, Giessen;

Margarete Arras, Zürich); 2016.

90. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2021.
91. Smith RS, Roderick TH, Sundberg JP. Microphthalmia and associated abnormalities in inbred black mice. *Laboratory animal science*. 1994;44(6):551-60.
92. Hubert M-F, Gerin G, Durand-Cavagna G. Spontaneous Ophthalmic Lesions in Young Swiss Mice. *Comp Med*. 1999;49(3):232-40.
93. Chan PP-m, Lai G, Chiu V, Chong A, Yu M, Leung CK-s. Anterior chamber angle imaging with swept-source optical coherence tomography: comparison between CASIAII and ANTERION. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18771.
94. Johnson M. Laboratory Mice and Rats. *Materials and Methods*. 2012;2.
95. Caro AC, Hankenson FC, Marx JO. Comparison of Thermoregulatory Devices Used during Anesthesia of C57BL/6 Mice and Correlations between Body Temperature and Physiologic Parameters. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2013;52(5):577-83.
96. Leung KK, Lai A, Wu A. A randomised controlled trial of the electric heating pad vs forced-air warming for preventing hypothermia during laparotomy. *Anaesthesia*. 2007;62(6):605-8.
97. Lang F, Busch GL, Völkl H. The Diversity of Volume Regulatory Mechanisms. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1998;8(1-2):1-45.
98. CEVARIO SJ, MACRI FJ. The Inhibitory Effect of Pentobarbital Na on Aqueous Humor Formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1974;13(5):384-6.

99. Camras LJ, Sufficool KE, Camras CB, Fan S, Liu H, Toris CB. Duration of Anesthesia Affects Intraocular Pressure, But Not Outflow Facility in Mice. *Current Eye Research*. 2010;35(9):819-27.
100. DONN A, MILLER SL, MALLETT NM. Water Permeability of the Living Cornea. *Archives of Ophthalmology*. 1963;70(4):515-21.
101. Dikstein S, Maurice DM. The active control of corneal hydration. *Israel Journal of Medical Sciences*. 1972;8(8):1523-8.
102. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Progress in retinal and eye research*. 2003;22(1):69-94.
103. Thiagarajah JR, Verkman AS. Aquaporin Deletion in Mice Reduces Corneal Water Permeability and Delays Restoration of Transparency after Swelling\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(21):19139-44.
104. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *International Review of Cytology*. 215: Academic Press; 2002. p. 395-431.
105. Kinoshita JH, Merola LO, Hayman S. Osmotic Effects on the Amino Acid-concentrating Mechanism in the Rabbit Lens. *Journal of Biological Chemistry*. 1965;240(1):310-5.
106. Cotlier E, Kwan B, Beaty C. The lens as an osmometer and the effects of medium osmolarity on water transport,  $^{86}\text{Rb}$  efflux and  $^{86}\text{Rb}$  transport by the lens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1968;150(4):705-22.
107. Zampighi GA, Eskandari S, Kreman M. Epithelial organization of the mammalian lens. *Experimental eye research*. 2000;71(4):415-35.
108. Kuwabara T. The maturation of the lens cell: a morphologic study. *Experimental Eye Research*. 1975;20(5):427-43.

109. Spector A, Wang GM, Wang RR, Li WC, Kuszak JR. A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. I. Transparency and epithelial cell layer. *Exp Eye Res.* 1995;60(5):471-81.
110. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *The FASEB Journal.* 1995;9(12):1173-82.
111. Hedbys BO, Mishima S. Flow of water in the corneal stroma. *Experimental Eye Research.* 1962;1(3):262-75.
112. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology.* 2000;24(7):1016-9.
113. Singh P, Tripathy K. Keratopathy. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
114. Wang G, Xue Y, Wang Y, Dong F, Shen M, Zong R, et al. The role of autophagy in the pathogenesis of exposure keratitis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2019;23(6):4217-28.
115. Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, Chen LZ, de Paiva CS, Olmos LC, et al. Matrix Metalloproteinase-9 Knockout Confers Resistance to Corneal Epithelial Barrier Disruption in Experimental Dry Eye. *The American Journal of Pathology.* 2005;166(1):61-71.
116. Grixti A, Sadri M, Edgar J, Datta AV. Common Ocular Surface Disorders in Patients in Intensive Care Units. *The Ocular Surface.* 2012;10(1):26-42.
117. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea.* 1992;11(3):221-5.

118. Eberle Heitzmann M, Thumm D, Baudouin C. A review of the efficacy, safety and tolerability of Lacrycon® eye drops for the treatment of dry eye syndrome. *Journal Français d'Ophtalmologie*. 2019;42(6):642-54.
119. Ruiz-Ederra J, Levin MH, Verkman AS. In Situ Fluorescence Measurement of Tear Film [Na<sup>+</sup>], [K<sup>+</sup>], [Cl<sup>-</sup>], and pH in Mice Shows Marked Hypertonicity in Aquaporin-5 Deficiency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50(5):2132-8.
120. Green K. Relation of Epithelial Ion Transport to Corneal Thickness and Hydration. *Nature*. 1968;217(5133):1074-5.
121. Abusharha AA, AlShehri TM, Hakami AY, Alsaqr AM, Fagehi RA, Alanazi SA, et al. Analysis of basal and reflex human tear osmolarity in normal subjects: assessment of tear osmolarity. *Therapeutic Advances in Ophthalmology*. 2018;10:2515841418794886.
122. Blaug SM, Canada AT, Jr. Relationship of viscosity, contact time and prolongation of action of methylcellulose-containing ophthalmic solutions. *American journal of hospital pharmacy*. 1965;22(12):662-6.
123. Thomasy SM, Eaton JS, Timberlake MJ, Miller PE, Matsumoto S, Murphy CJ. Species Differences in the Geometry of the Anterior Segment Differentially Affect Anterior Chamber Cell Scoring Systems in Laboratory Animals. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(1):28-37.
124. Camber O, Edman P. Sodium hyaluronate as an ophthalmic vehicle: Some factors governing its effect on the ocular absorption of pilocarpine. *Current Eye Research*. 1989;8(6):563-7.
125. Tillman WJ, Kuramoto R. A study of the interaction between methylcellulose and preservatives. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 1957;46(4):211-4.

126. Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Jurus RA, Zieske JD, Stepp MA. BALB/c and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. *Experimental Eye Research.* 2008;87(5):478-86.
127. Lang F. Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation. *Journal of the American College of Nutrition.* 2007;26(sup5):613S-23S.
128. Puk O, Dalke C, Favor J, de Angelis MH, Graw J. Variations of eye size parameters among different strains of mice. *Mammalian Genome.* 2006;17(8):851-7.
129. Seo K, Yoon S, Han S, Song J, Kim HK, Jung HS. Standardization for mouse phenotype in various stain with optical coherent tomography (OCT) and electroretinography (ERG). *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2016;57(12):642-.
130. Beebe DC, Parmelee JT, Belcher KS. Volume regulation in lens epithelial cells and differentiating lens fiber cells. *Journal of Cellular Physiology.* 1990;143(3):455-9.
131. Zhang JJ, Jacob TJ. Volume regulation in the bovine lens and cataract. The involvement of chloride channels. *The Journal of Clinical Investigation.* 1996;97(4):971-8.
132. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Paraffin embedding tissue samples for sectioning. *CSH protocols.* 2008;2008:pdb.prot4989.
133. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;2014(6):655-8.
134. Sorden SD, Larsen T, McPherson LE, Turner OC, Carroll EE, Sharma AK. Spontaneous background and procedure-related microscopic findings and common artifacts in ocular tissues of laboratory animals in ocular studies. *Toxicologic*

pathology. 2021;49(3):569-80.

## **9. Anhang**

### **9.1. Anhang 1**

Unscharfe Scans:	Bewegungs-/Laserartefakte:
1006 OD 40min	1012 OS 40min
2006 OS 15min	1512 OS 40min
3003 OD 55min	3001 OS 45+55min
3007 OD 55min	3003 OD 15+25min
4005 OD 35min	3501 OD 15+25+35min
4502 OD 15min	6001 OD 35+45min
5004 OD 5min	6501 OD 15min
5006 OD 55min	6505 OD 15+ 25min

**Tabelle 15: Ausgeschlossene OCT-Messzeitpunkte einzelner Tiere**

### **9.2. Anhang 2**

Die folgende Tabelle (Tabelle 16) gibt eine Übersicht über die Benennung der Tiere innerhalb der Gruppen:

Gruppe	Geschlecht	Tiernummer
<b>1</b>	M	1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012
<b>1</b>	W	1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512
<b>2a</b>	M	2001, 2002, 2003, 8002
<b>2a</b>	W	2501, 2502, 2503, 2504, 8502
<b>2b</b>	M	2004, 2005, 2006, 2007, 8003
<b>2b</b>	W	2505, 2506, 2507, 8503
<b>3</b>	M	3001, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3007
<b>3</b>	W	3501, 3502, 3503, 3504, 3505, 3506, 3507
<b>4</b>	M	4001, 4002, 4003, 4004, 4005, 4006, 4007
<b>4</b>	W	4501, 4502, 4503, 4504, 4505, 4506, 4507
<b>5</b>	M	5001, 5002, 5003, 5004, 5005, 5006, 5007
<b>5</b>	W	5501, 5502, 5503, 5504, 5505, 5506, 5507
<b>6</b>	M	6001, 6002, 6003, 6004, 6005, 6006, 6007

6 W

6501, 6502, 6503, 6504, 6505, 6506, 6507

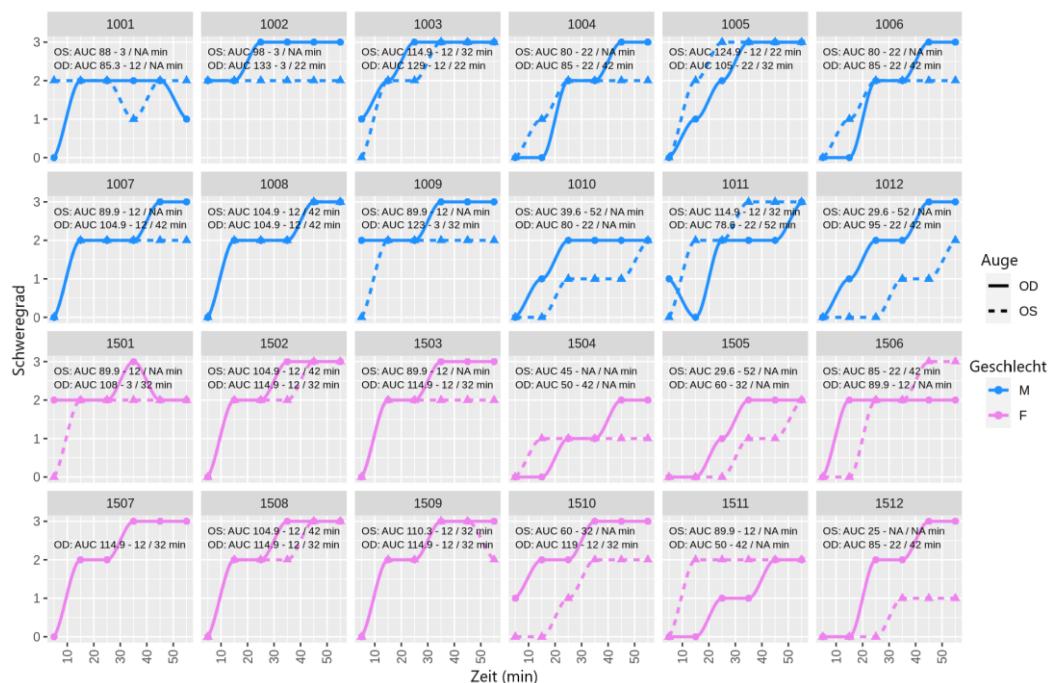
**Tabelle 16: Übersicht über die Tiernummerierung innerhalb der jeweiligen Gruppen, M= Männlich, W=Weiblich**

Dies erklärt die Bezeichnungen der im folgenden angehängten Abbildungen der Kataraktentwicklung und Rückentwicklung

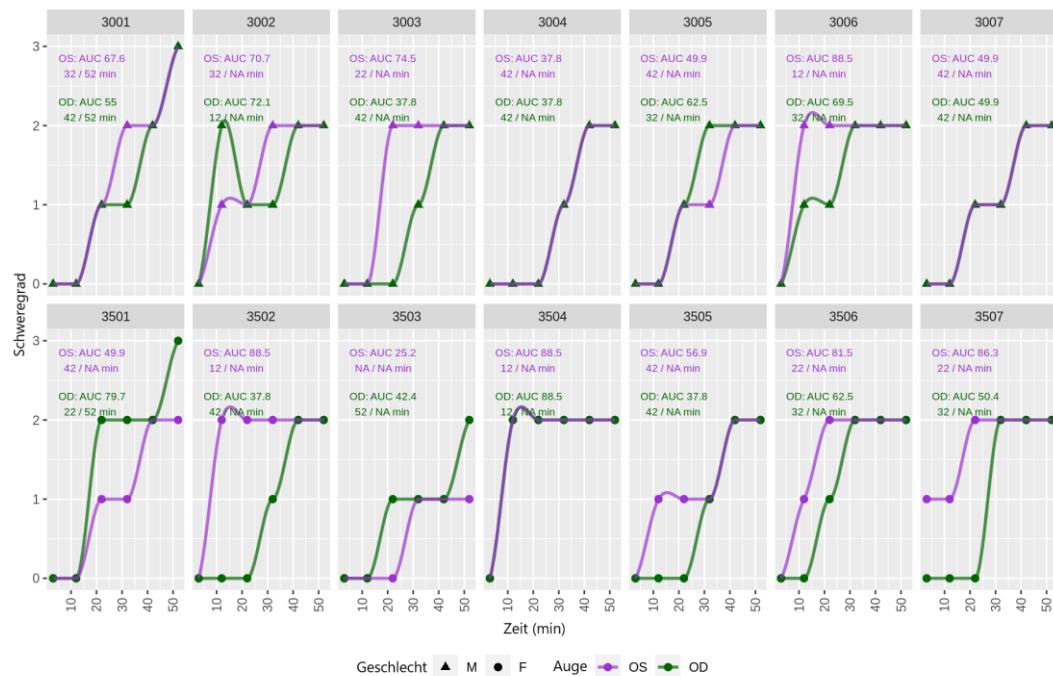
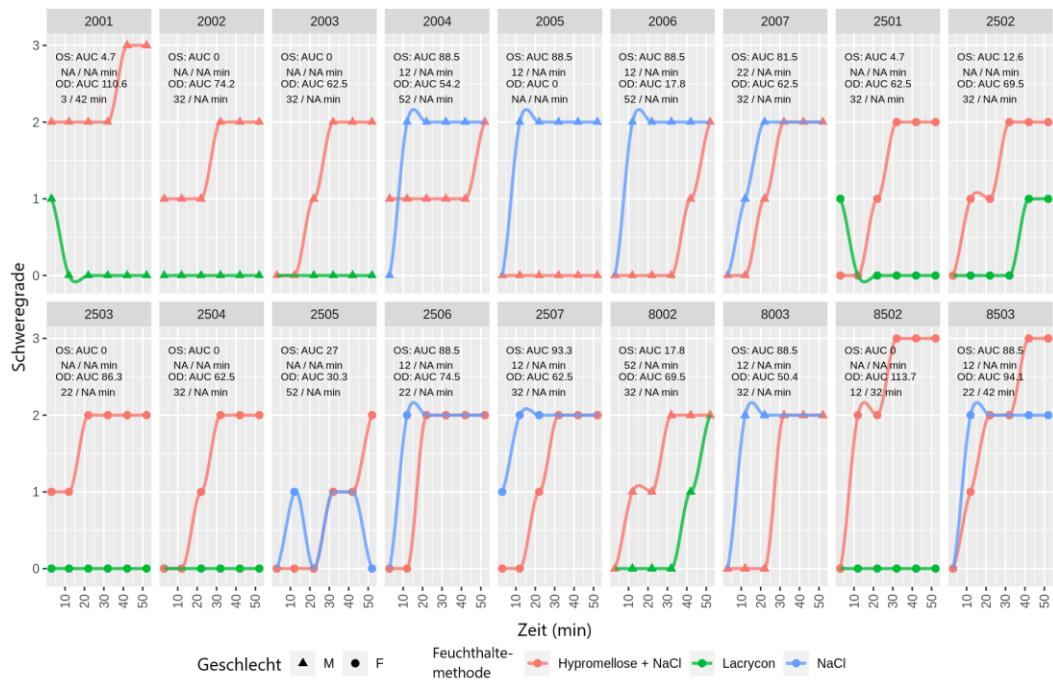
### 9.2.1. Anhang 2.1

Die Abbildungen 53-76 zeigen die Entwicklung der Kataraktgrade, der AKfB, SHB und IRB. Der individuelle Verlauf der einzelnen Tiere wird mithilfe LOESS-geglätteter Kurven veranschaulicht.

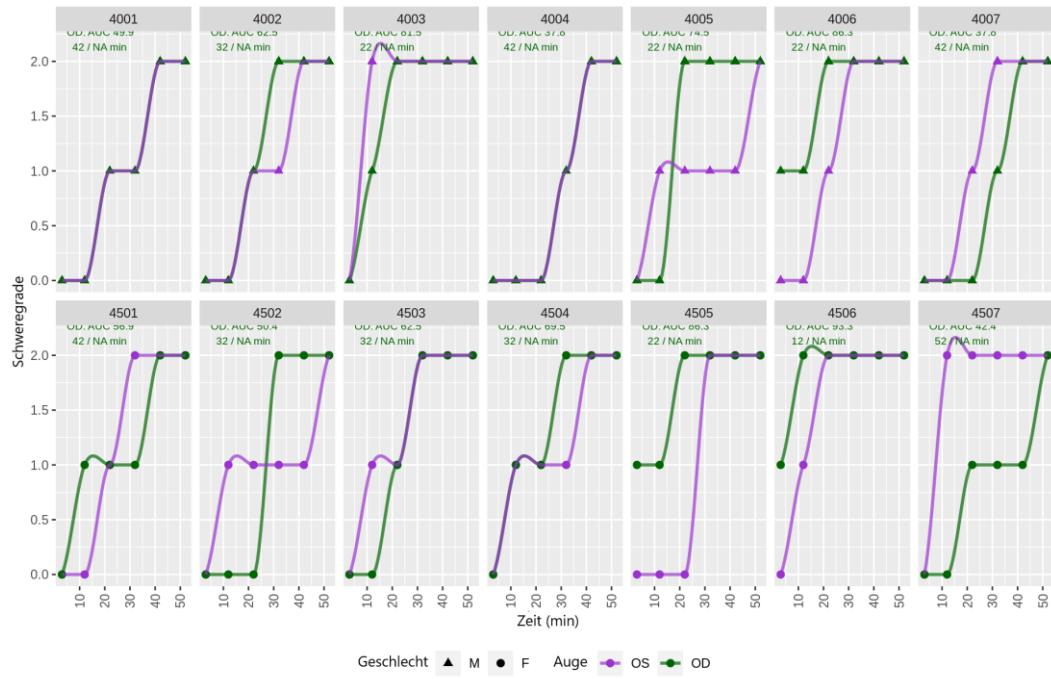
#### Grad:



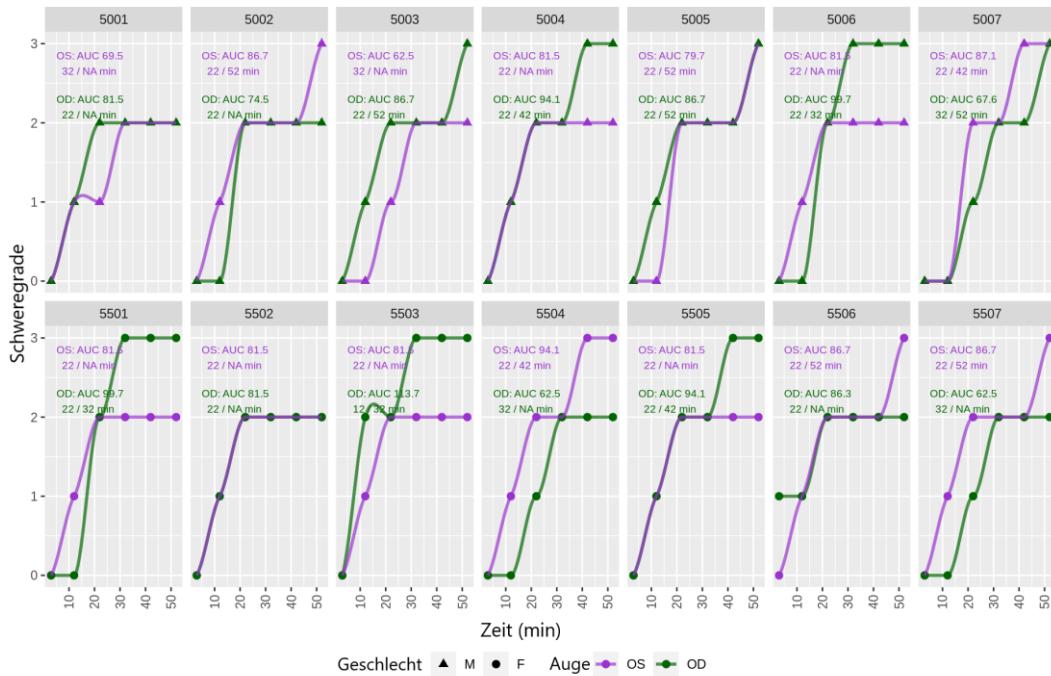
**Abbildung 53: Individueller Verlauf Entwicklung Kataraktgrade während der Anästhesie, Gruppe 1 (inklusive AUC-Mittelwert und frühhster Zeitpunkt Grad 2 und höher bzw. 3)**



## Grad 2 und höher bzw. 3)

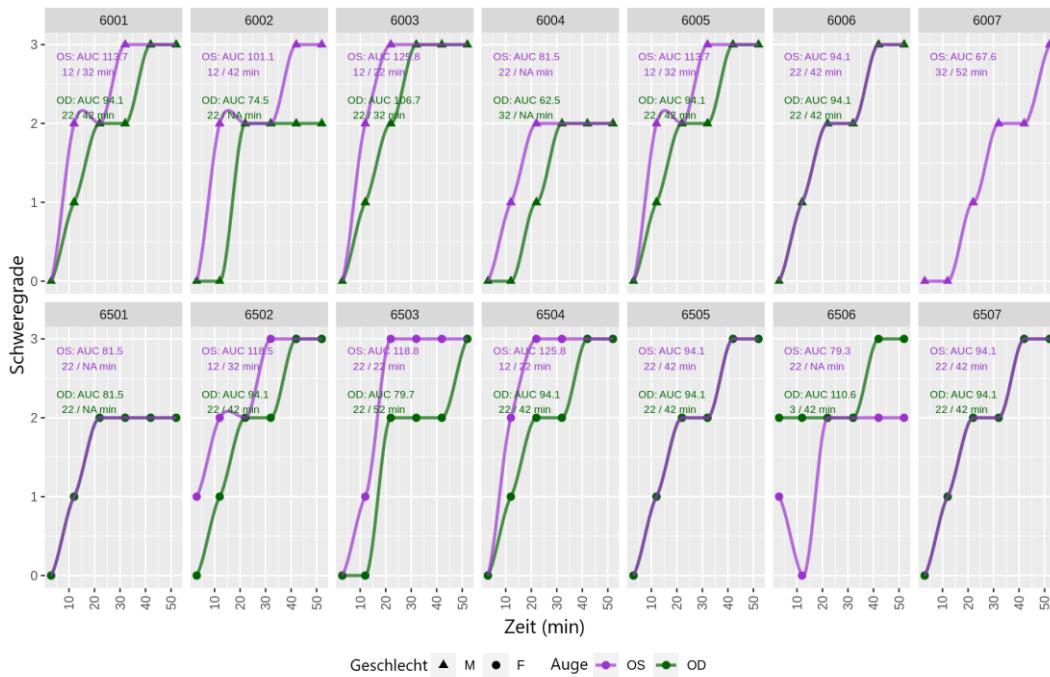


**Abbildung 56: Individueller Verlauf Entwicklung Kataraktgrade während der Anästhesie, Gruppe 4 (inklusive AUC-Mittelwert und frühhster Zeitpunkt Grad 2 und höher bzw. 3)**

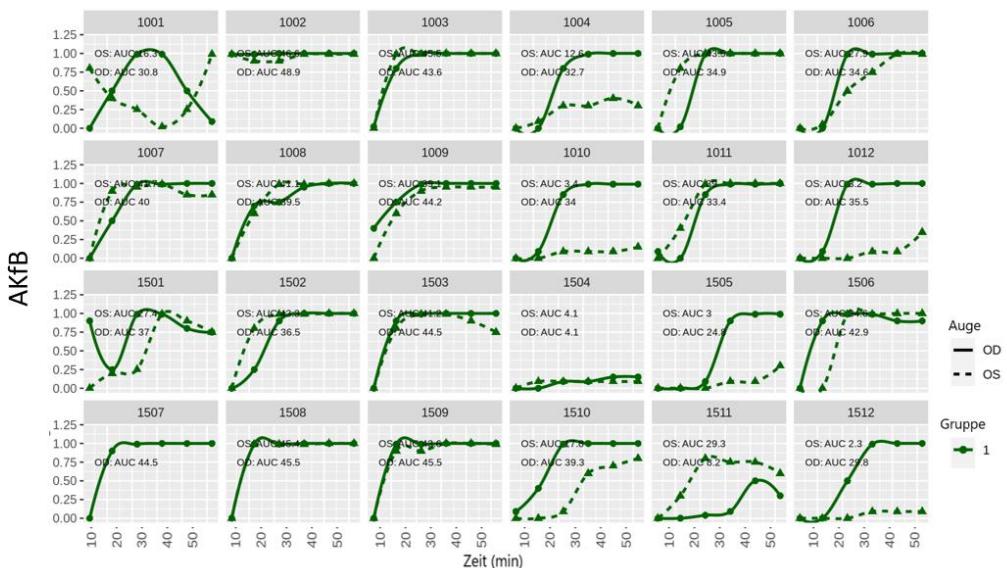


**Abbildung 57: Individueller Verlauf Entwicklung Kataraktgrade während der Anästhesie, Gruppe 5 (inklusive AUC-Mittelwert und frühhster Zeitpunkt Grad 2 und höher bzw. 3)**

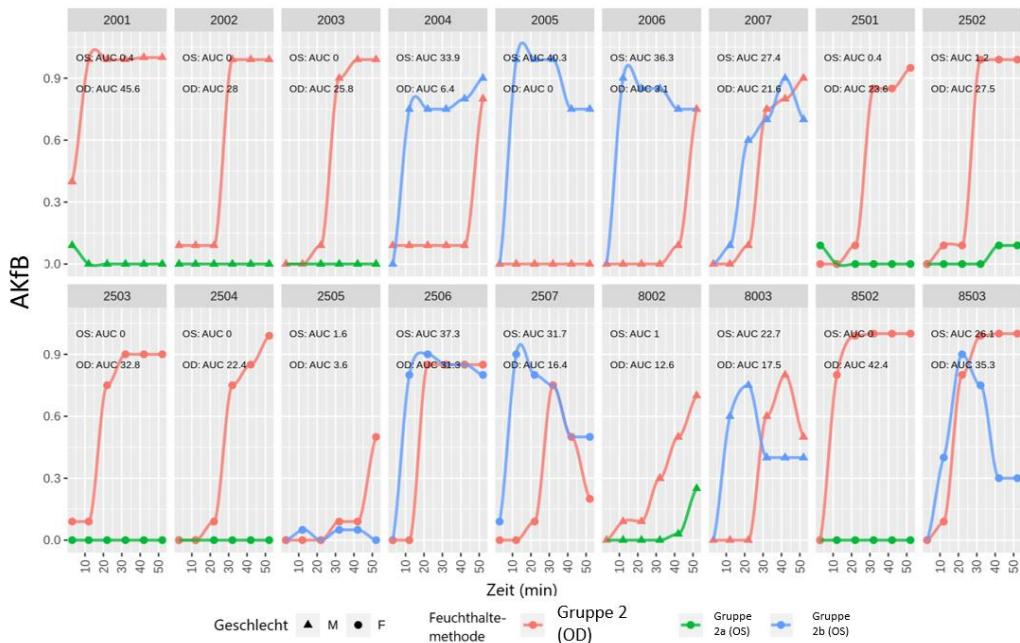
## Grad 2 und höher bzw. 3)



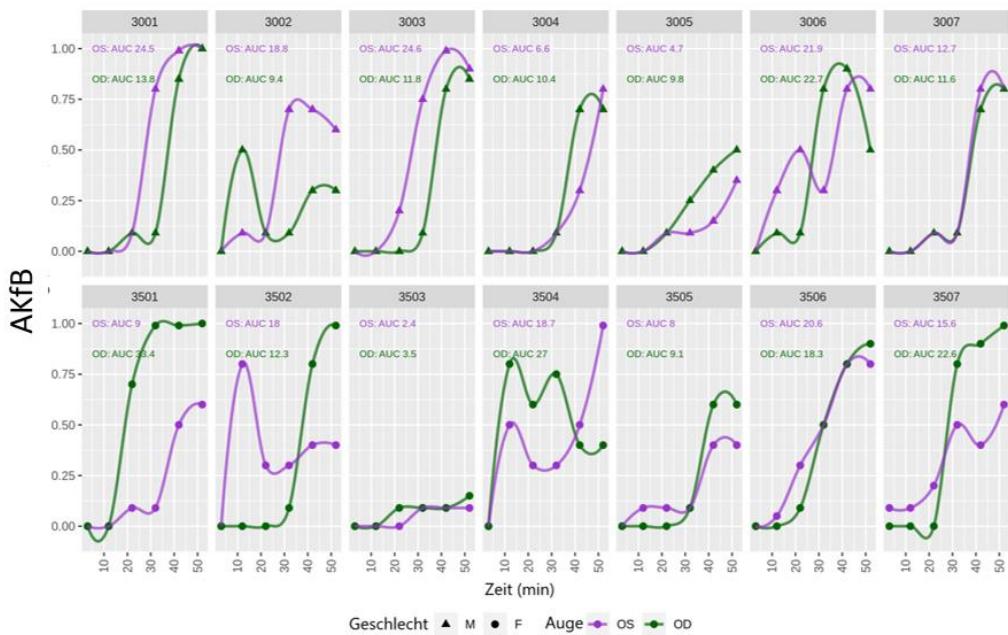
**Abbildung 58: Individueller Verlauf Entwicklung Kataraktgrade während der Anästhesie, Gruppe 6 (inklusive AUC-Mittelwert und frühesten Zeitpunkt Grad 2 und höher bzw. 3)**

**AKfB:**

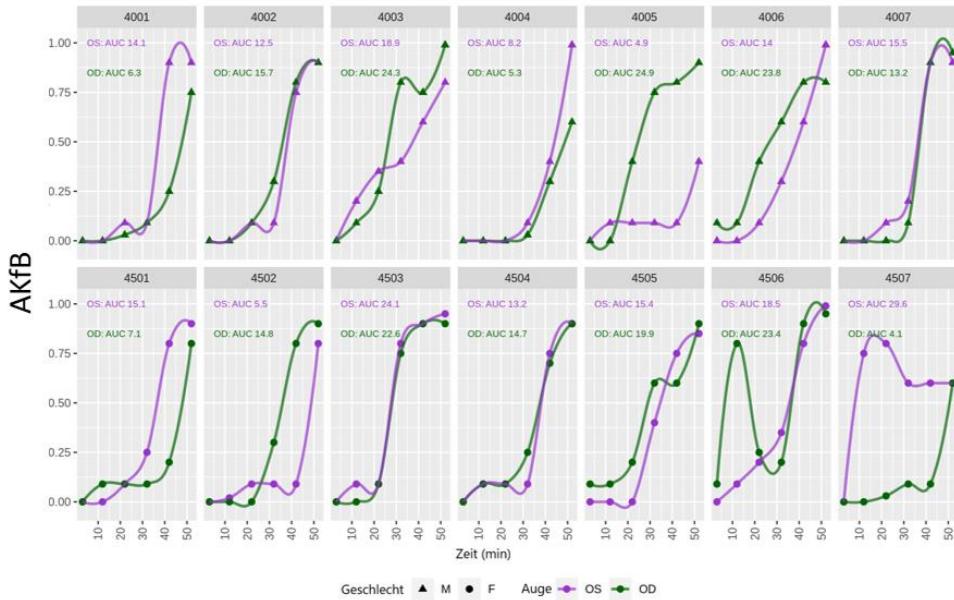
**Abbildung 59: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 1 (inklusive**

**AUC-Mittelwert**

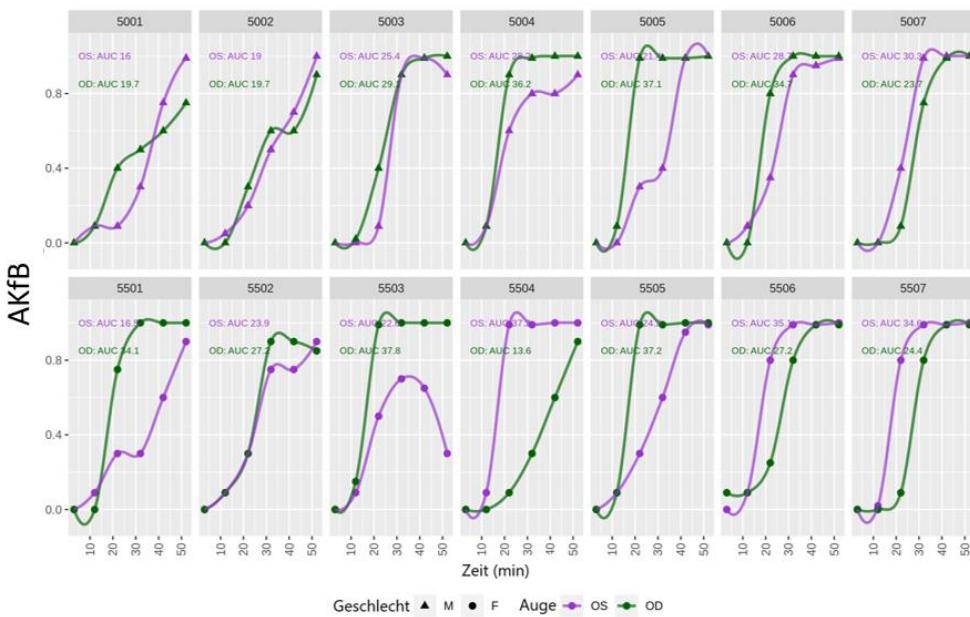
**Abbildung 60: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 2 (inklusive AUC-Mittelwert)**



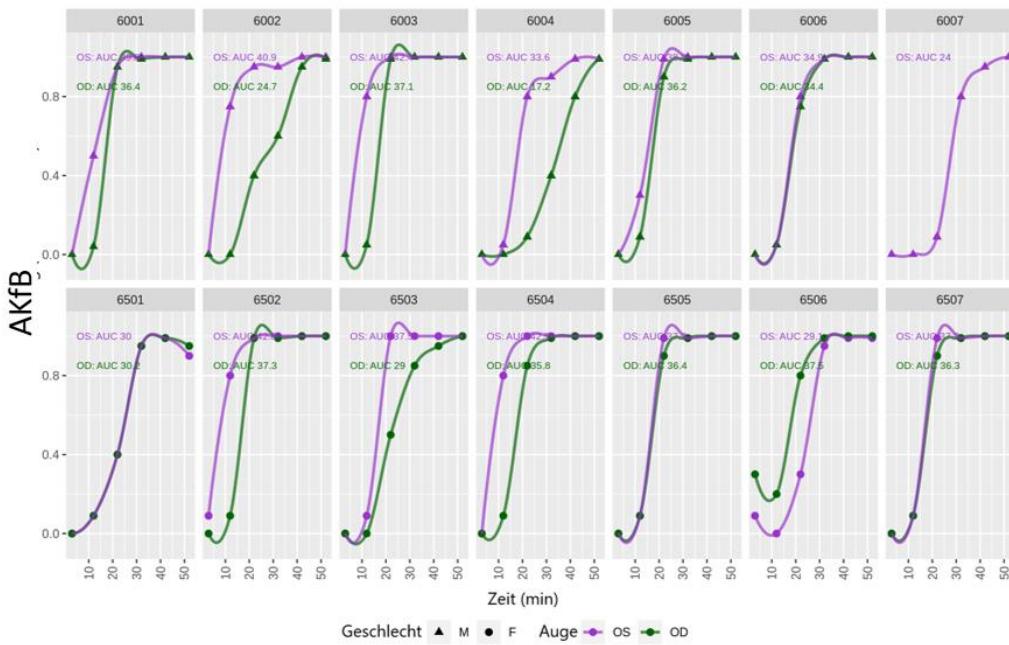
**Abbildung 61: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 3 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**AUC-Mittelwert**

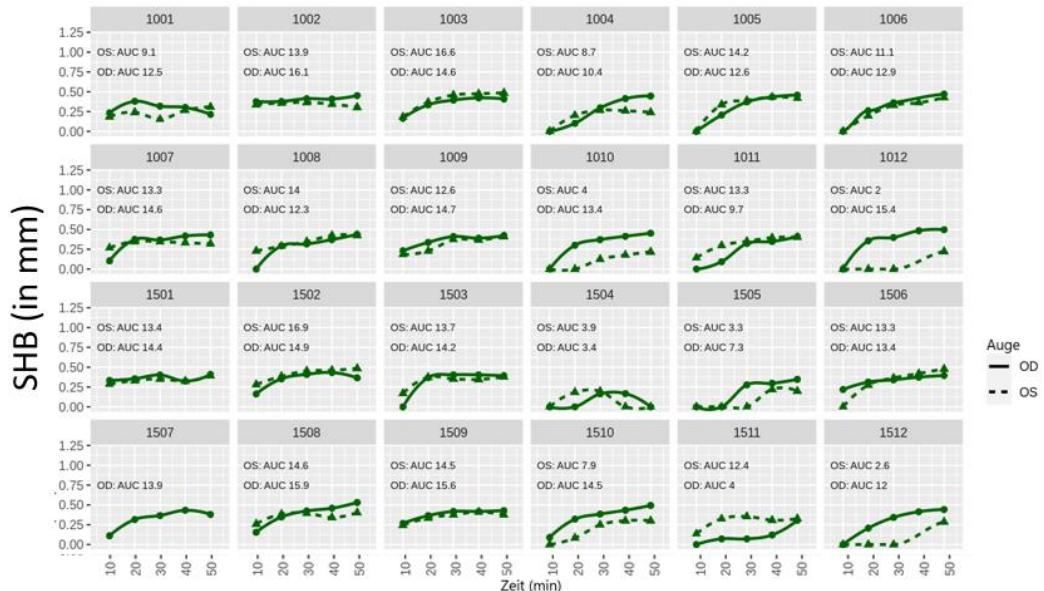
**Abbildung 62: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 4 (inklusive AUC-Mittelwert)**



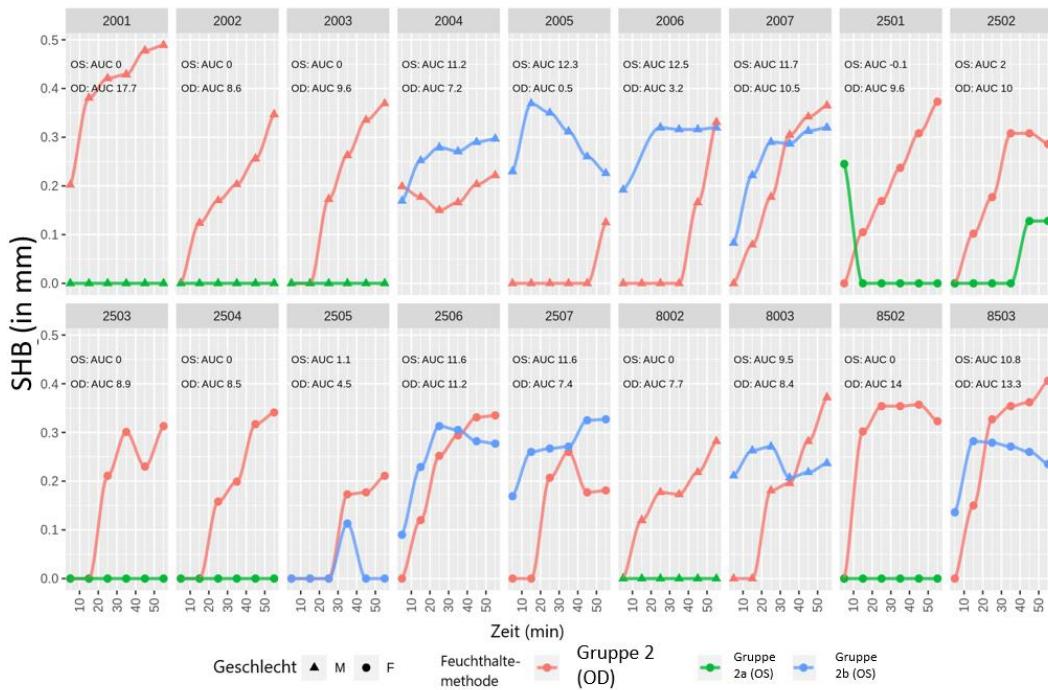
**Abbildung 63: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 5 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**AUC-Mittelwert)**

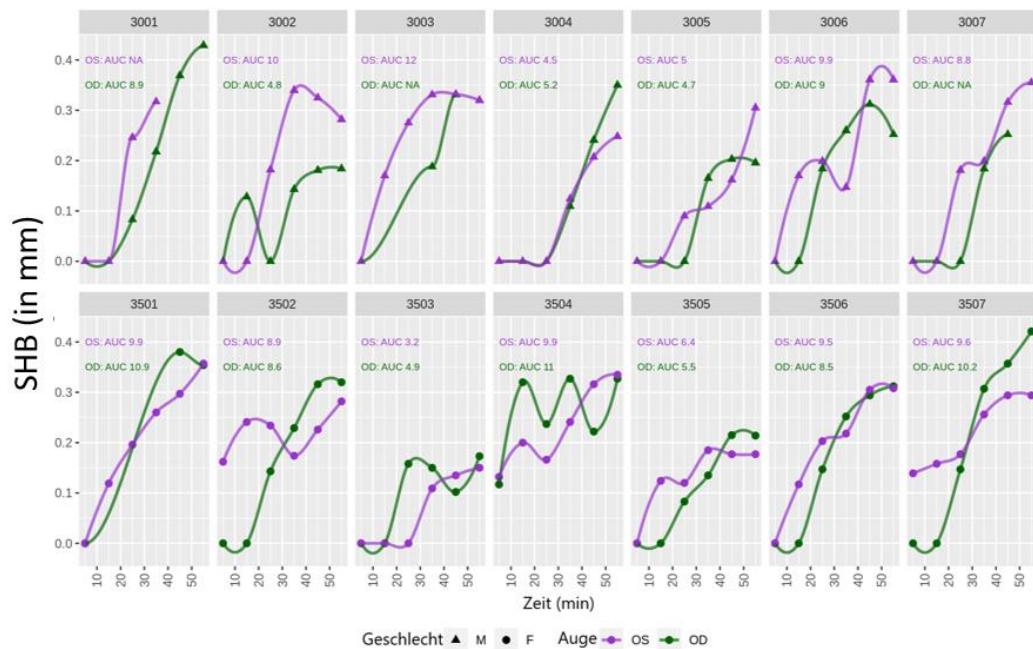
**Abbildung 64: Individueller Verlauf Entwicklung AKfB Gruppe 6 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**SHB:**

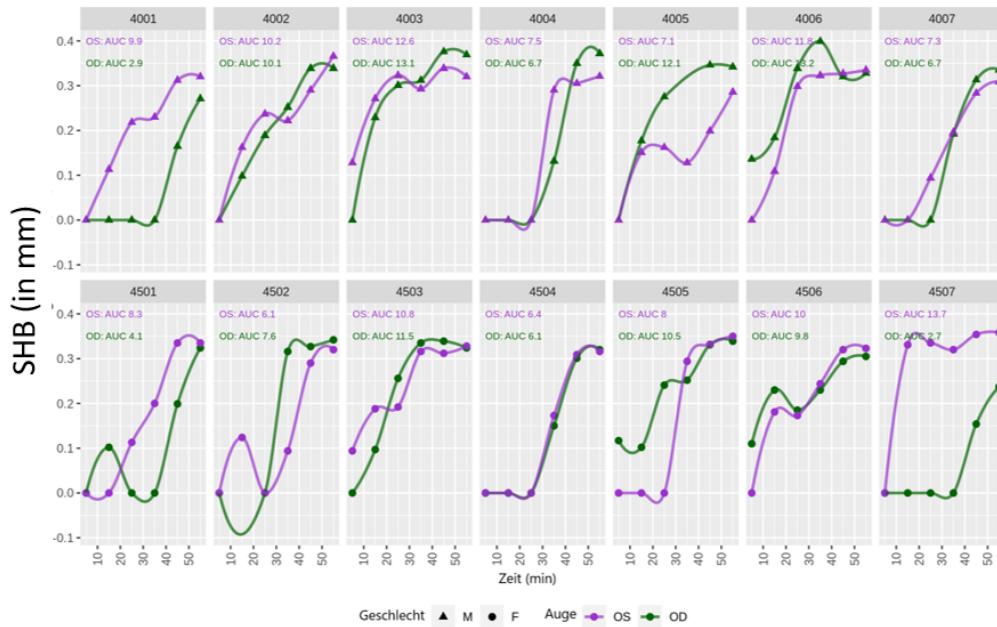
**Abbildung 65: Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 1 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**AUC-Mittelwert)**

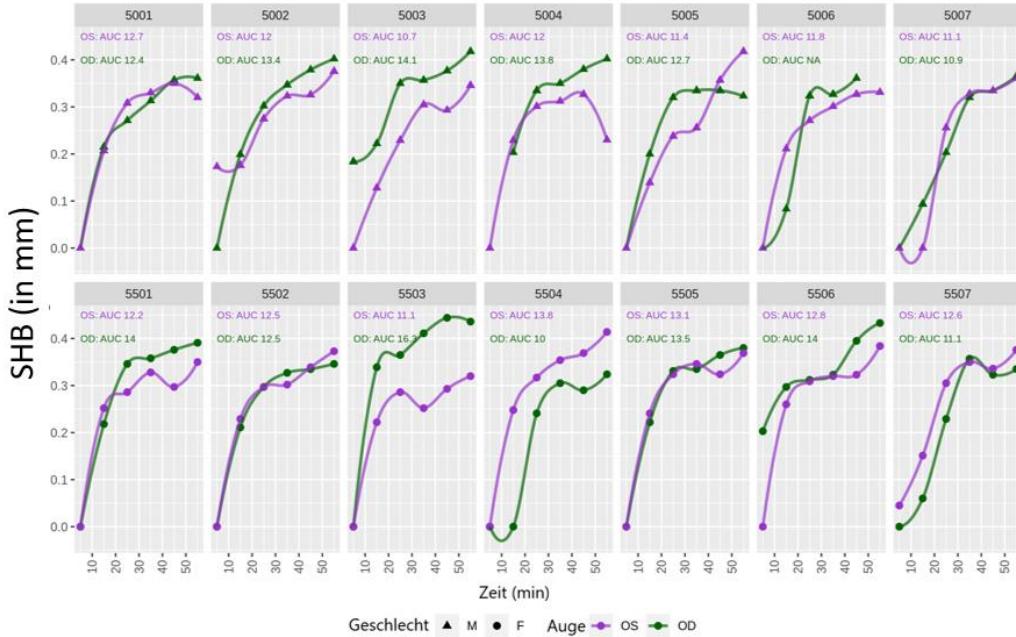
**Abbildung 66: Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 2 (inklusive AUC-Mittelwert)**



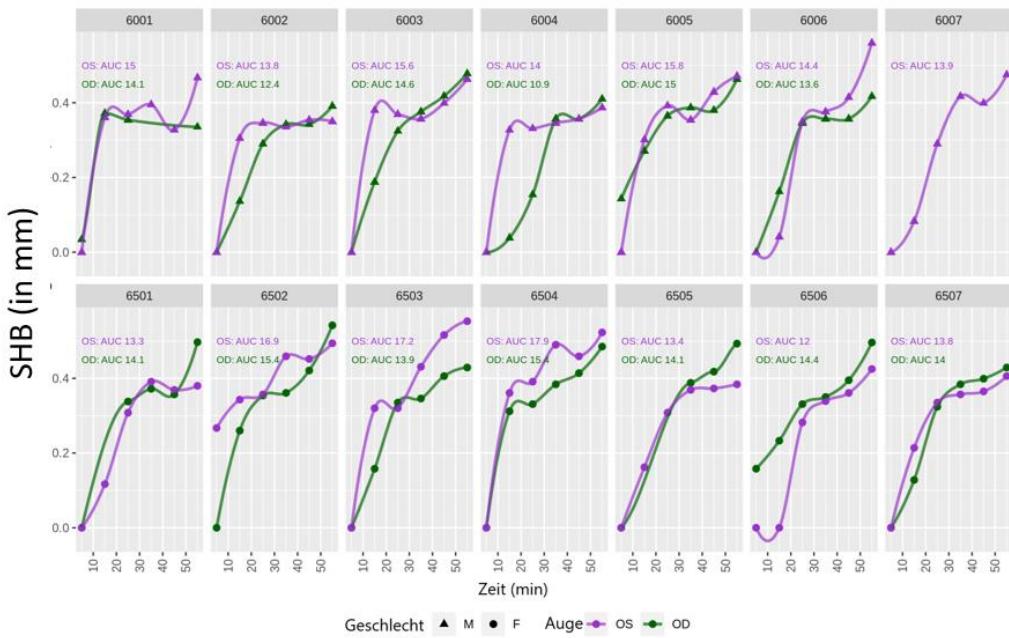
**Abbildung 67: Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 3 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**AUC-Mittelwert**

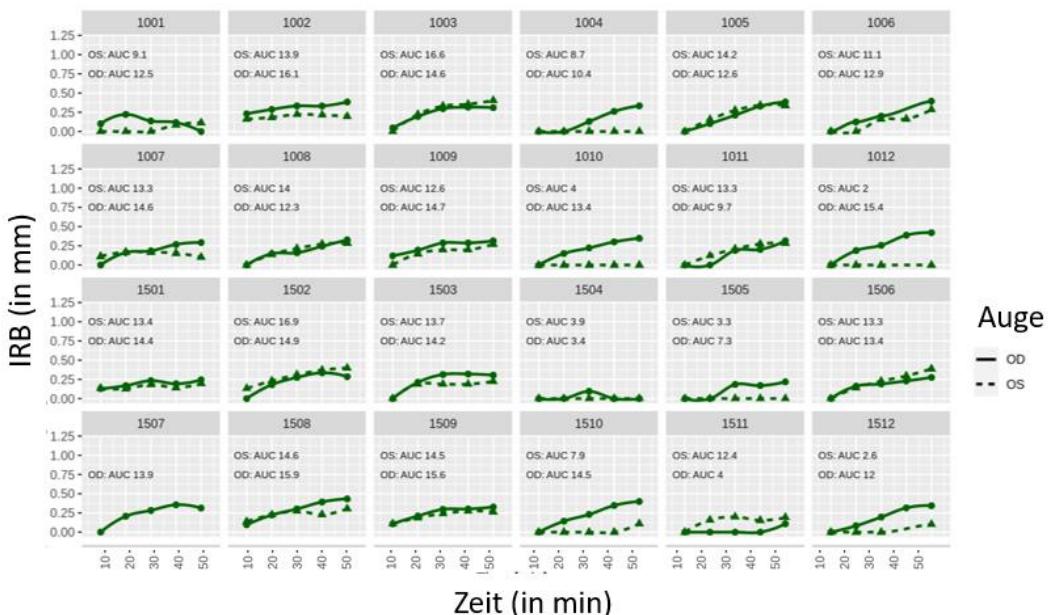
**Abbildung 68: Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 4 (inklusive AUC-Mittelwert)**



**Abbildung 69: Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 5 (inklusive**

**AUC-Mittelwert)**

**Abbildung 70 Individueller Verlauf Entwicklung SHB Gruppe 6 (inklusive AUC-Mittelwert)**

**IRB:**

**Abbildung 71: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 1 (inklusive AUC-Mittelwert)**

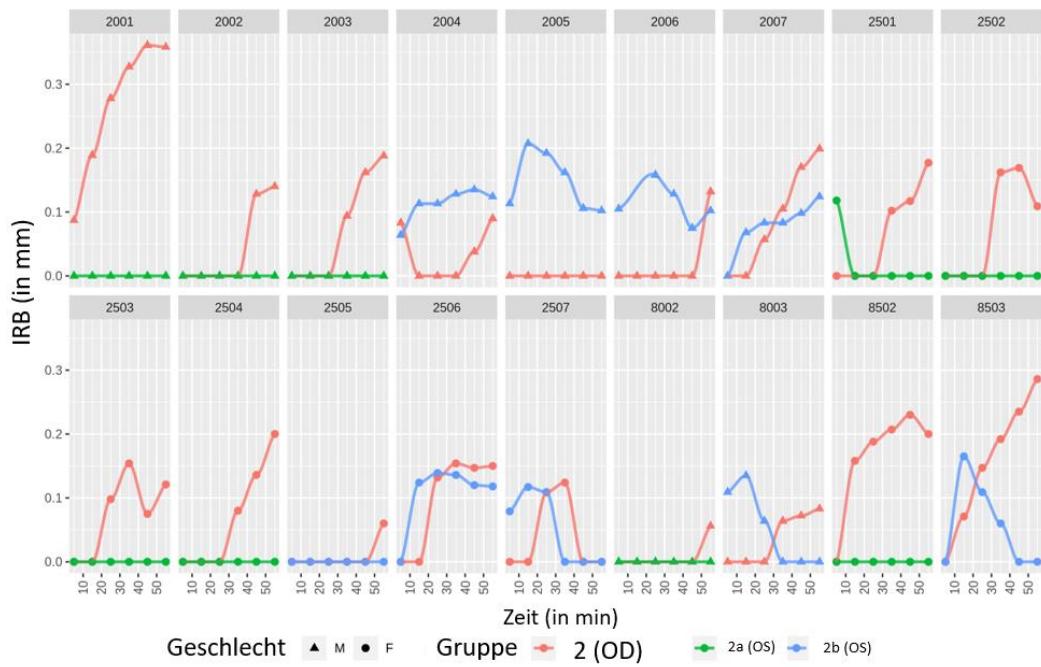


Abbildung 72: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 2

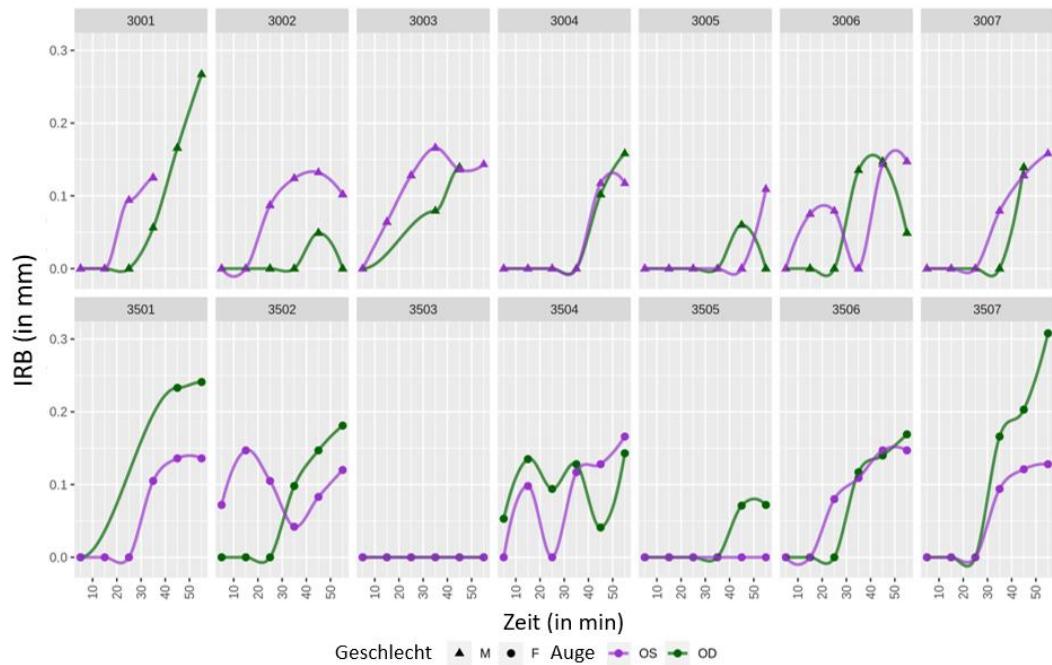
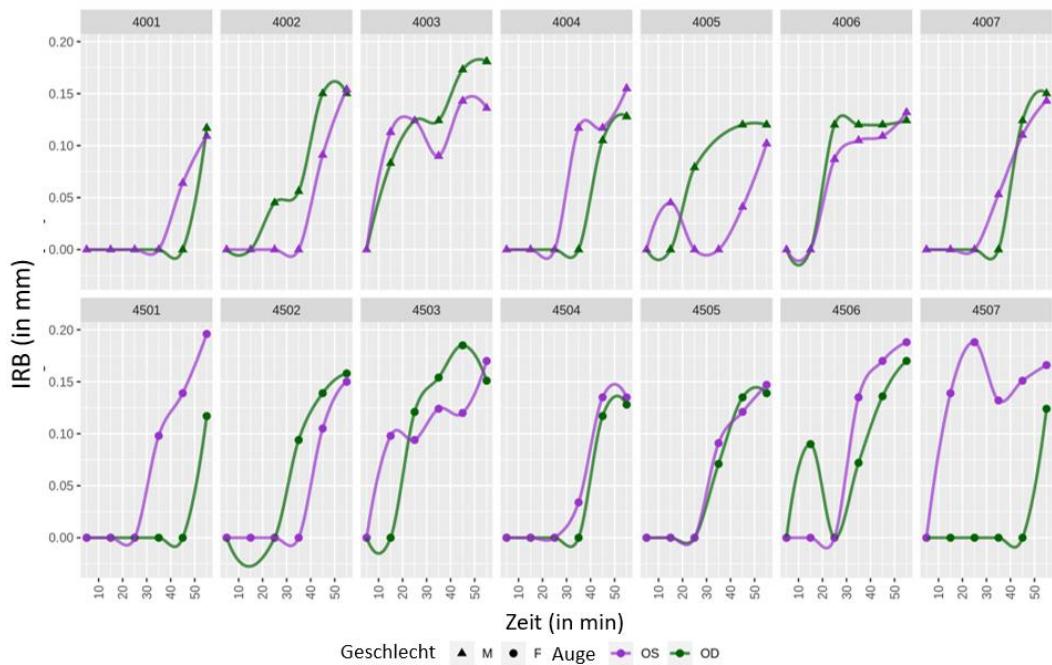
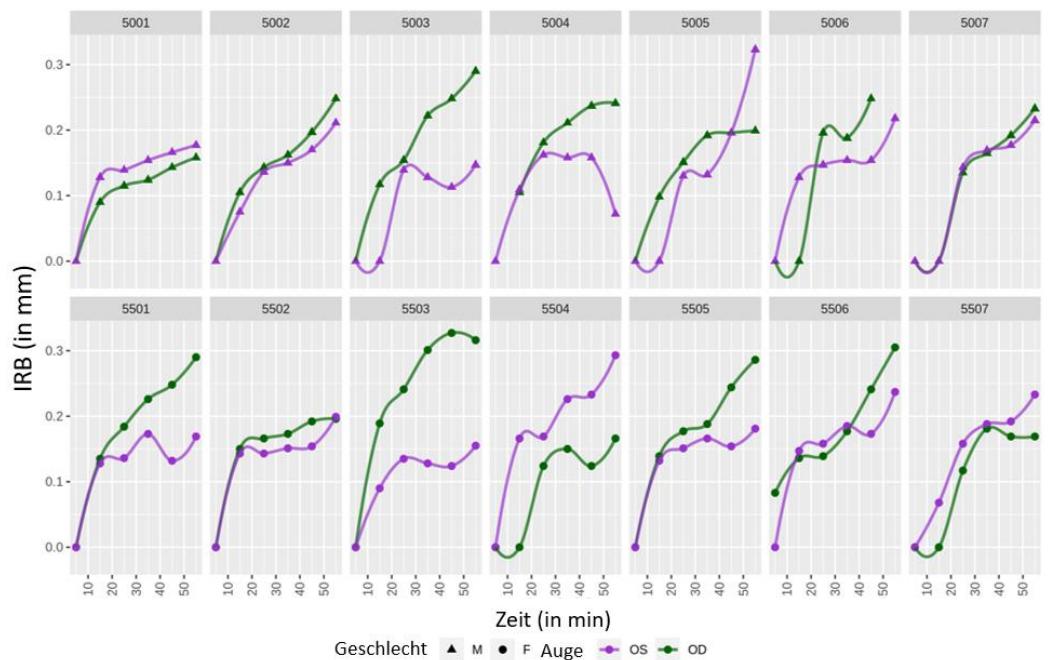


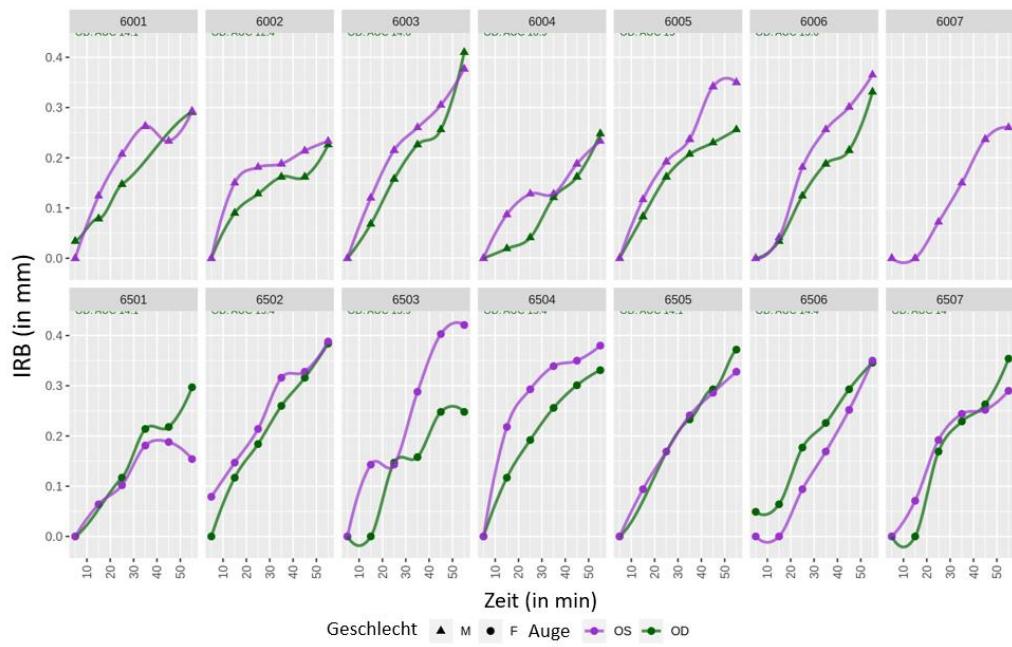
Abbildung 73: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 3



**Abbildung 74: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 4**



**Abbildung 75: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 5**



**Abbildung 76: Individueller Verlauf Entwicklung IRB Gruppe 6**

### 9.2.2. Anhang 2.2

Die folgenden Abbildungen zeigen die Rückentwicklung der Katarakt in Form der Darstellung der AUC-Werte verschiedener Parameter der einzelnen, untersuchten Tiere.

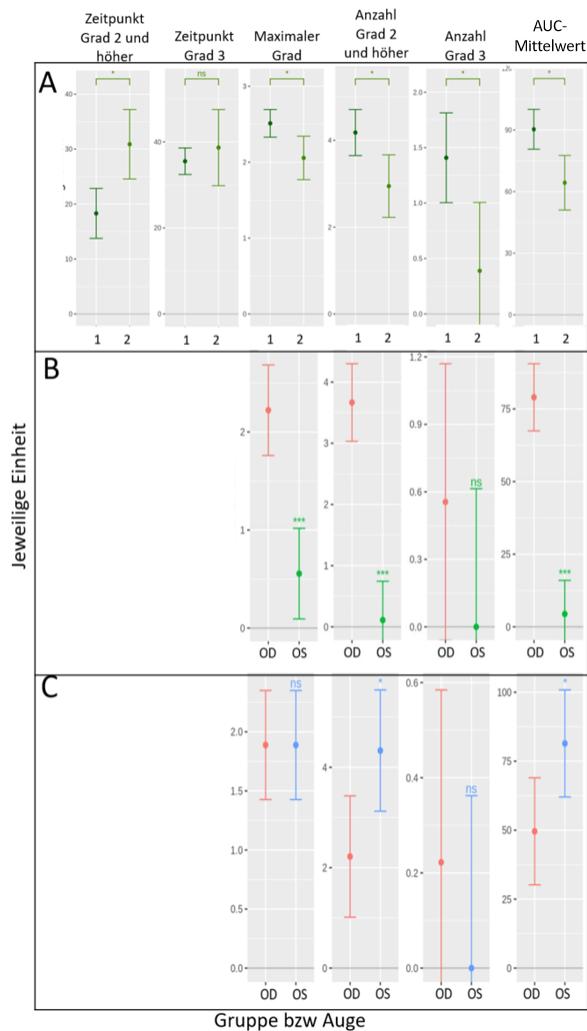
**Grad:**



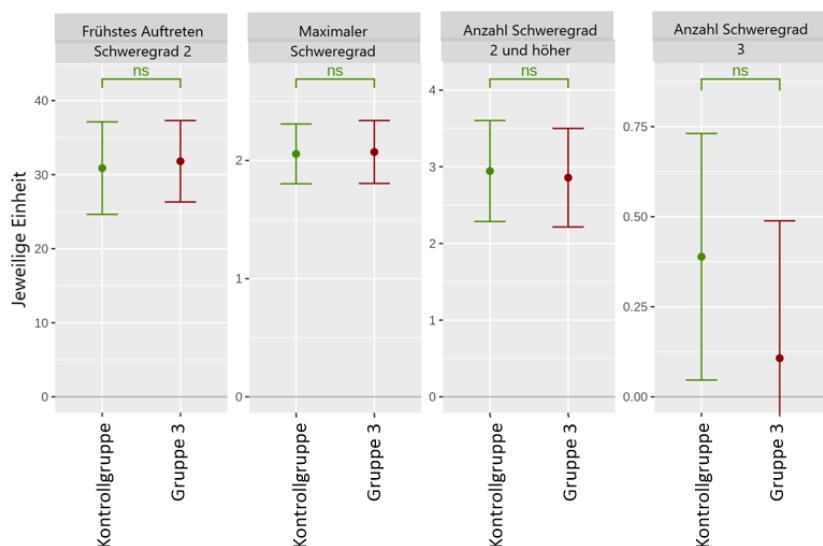
Abbildung 77: Kataraktentwicklung der Grade nach Beenden der Anästhesie

## der einzelnen Tiere

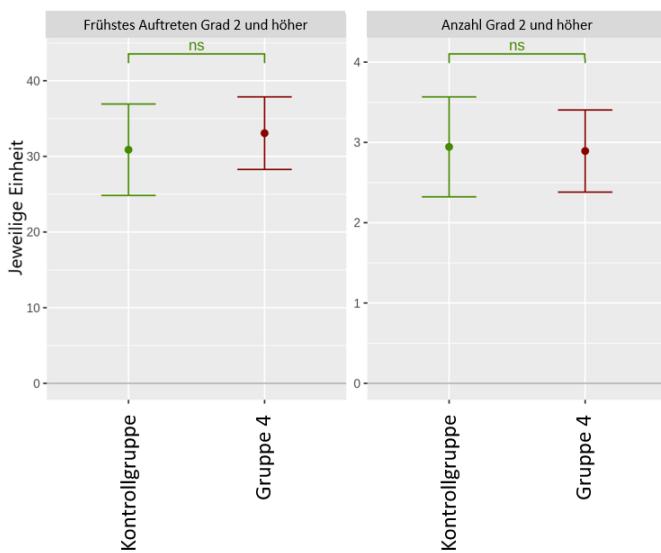
## 9.3. Anhang 3



**Abbildung 78: Vergleich Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall verschiedener Parameter, A: Gruppe 1 und 2 (OD), B: Gruppe 2a (OD und OS) C: Gruppe 2b (OD und OS); \*/\*\*\*= Unterschied signifikant, ns= nicht signifikant**

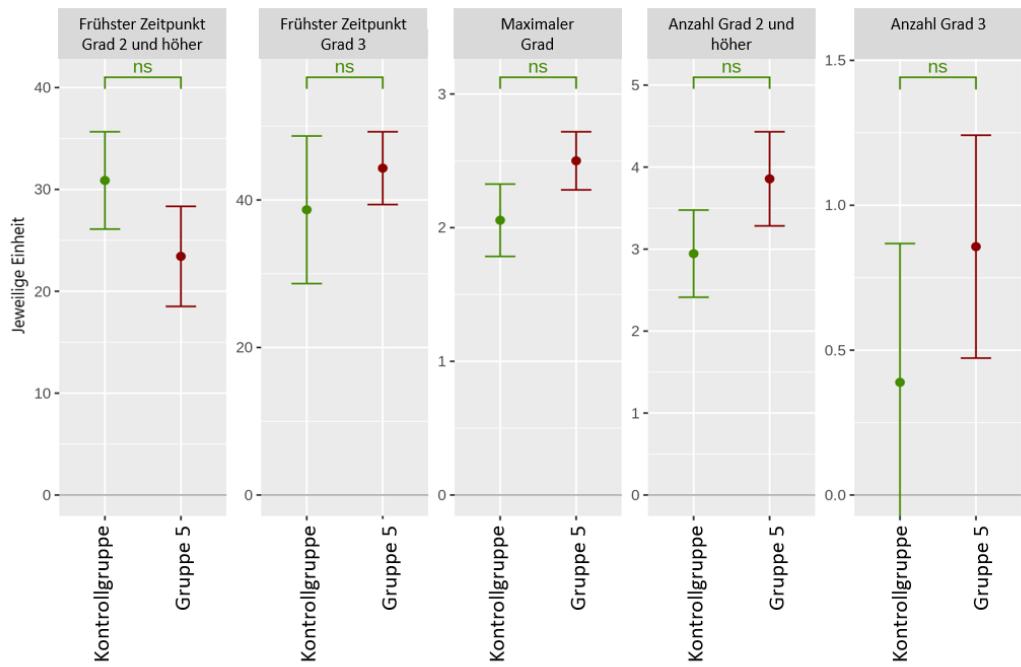


**Abbildung 79: Vergleichende Darstellung Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall verschiedener Parameter Gruppe 3 und Kontrollgruppe, ns=nicht signifikant**

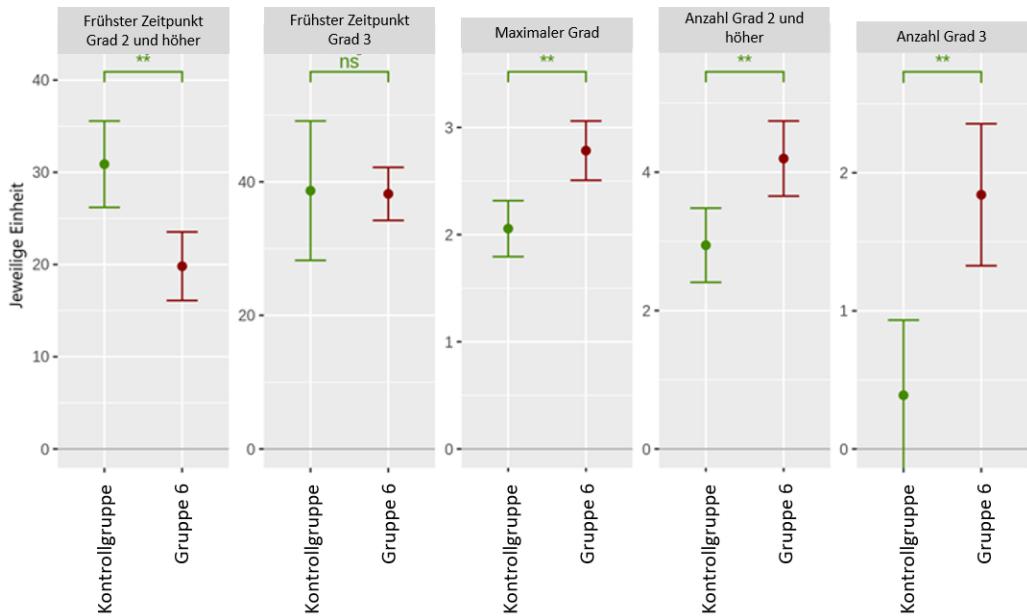


**Abbildung 80: Vergleichende Darstellung Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall verschiedener Parameter Gruppe 4 und Kontrollgruppe,**

**ns=nicht signifikant**



**Abbildung 81: Vergleichende Darstellung Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall verschiedener Parameter Gruppe 5 und Kontrollgruppe**



**Abbildung 82: Vergleichende Darstellung Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall verschiedener Parameter Gruppe 6 und Kontrollgruppe;**

ns=nicht signifikant

#### 9.4. Anhang 4: Konkrete p-Werte der statistischen Auswertung

Messwert	p-Wert	Signifikanz
AUC Grad der Katarakt (0-60min)	0	***
AUC AKfB (0-60min)	0	***
AUC SHB (0-60min)	0	***
AUC IRB (0-60min)	0	***

**Tabelle 17: Effekt-Test bezüglich des Einflusses der Behandlungsmethoden (=verschiedener Gruppen) auf die Kataraktformation, \*\*\*= statistisch signifikant**

Kontrast	Gemessener Parameter	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 2-1	Maximum	Grad der Katarakt	-0,46	-0,79	-0,12	0,0319102 *
		AKfB (Anteil)	-0,04	-0,2	0,12	0,6501813 ns
		SHB (in mm)	-0,07	-0,11	-0,02	0,0160609 *
		IRB (in mm)	-0,1	-0,17	-0,04	0,0062516 **
	Maximale Anzahl der Grade	2+3	-1,23	-2,13	-0,34	0,0319102 *
		3	-1,02	-1,76	-0,28	0,0319102 *
	Frühestes Auftreten der Grade	2+3 (in min)	12,58	4,8	20,36	0,0134992 *
		3 (in min)	3,17	-6,2	12,54	0,4884021 ns
	AUC	Grad (in Grad*min)	-26,01	-42,47	-9,56	0,0136423 *
		AKfB (Anteil *min)	-10,17	-18,48	-1,86	0,03541 *
		SHB (in mm*min)	-2,83	-5,21	-0,45	0,0209992 *
		IRB (in mm*min)	-3,19	-5,29	-1,08	0,0062516 **

**Tabelle 18: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen beim Vergleich der Gruppe 2 (OD) mit Gruppe 1; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls, P-Wert angepasst mit der Holm-Methode; \*\*= Unterschied signifikant, ns= nicht signifikant**

Kontrast	Gemessene Parameter	Differenz	Unters KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 2a (OS-OD)	Maximum	Grad	-1,67	-2,32	-1,01	0,0007371 ***
		AKfB (Anteil)	-0,89	-0,99	-0,79	0,0000001 ***
		SHB (in mm)	-0,31	-0,39	-0,23	0,0000413 ***
		IRB (in mm)	-0,17	-0,24	-0,1	0,0008742 ***
	Maximale Anzahl Grad	2+3	-3,56	-4,45	-2,66	0,000033 ***
		3	-0,56	-1,42	0,31	0,3571908 ns
	AUC	Grad (in Grad*min)	-74,58	-90,94	-58,21	0,0000117 ***
		AKfB (Anteil Oberfläche *min)	-28,63	-36,44	-20,82	0,0000587 ***
		SHB (in mm*min)	-10,31	-12,86	-7,77	0,0000281 ***
		IRB (in mm *min)	-4,48	-7,3	-1,66	0,0127882 *

**Tabelle 19: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 2a (OS verglichen mit OD), P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**

Kontrast	Gemessene Parameter	Differenz	Unters KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 2b (OS-OD)	Maximum	Grad (in Grad)	0	-0,65	0,65	1 ns
		AKFB (Anteil Oberfläche)	0,09	-0,2	0,39	0,4857184 ns
		SHB (in mm)	0	-0,09	0,09	0,9666426 ns
		IRB (in mm)	0,01	-0,07	0,08	0,8596614 ns
	Maximale Anzahl Grad	2+3	2,11	0,65	3,57	0,0103409 *
		3	-0,22	-0,73	0,29	0,3571908 ns
	AUC	Grad (in Grad*min)	31,87	7,72	56,02	0,0159872 *
		AKFB (Anteil Oberfläche *min)	13,56	0,69	26,43	0,0412101 *
		SHB (in mm*min)	2,91	6,81	1,72	0,1239347 ns
		IRB (in mm*min)	0,87	-1,71	3,45	0,4598768 ns

**Tabelle 20: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 2b (OS verglichen mit OD), P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**

Kontrast	Gemessener Parameter	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 3-Kontrollgruppe	Maximum	Grad (in Grad)	0,02	-0,35	0,38	1 ns
		AKfb (Anteil Oberfläche)	-0,1	-0,27	0,08	0,2700594 ns
		SHB (in mm)	-0,02	-0,07	0,03	0,7249983 ns
		IRB (in mm)	-0,02	-0,07	0,03	0,8141968 ns
	Maximale Anzahl von Grad	2+3	-0,09	-1,01	0,83	1 ns
		3	-0,28	-0,79	0,23	1 ns
	Frühestes Auftreten von Grad	2+3 (in min)	0,93	-7,4	9,25	1 ns
		Grad (in Grad*min)	-3,61	-19,42	12,21	1 ns
		AKFB (Anteil Oberfläche *min)	-6,95	-14,25	0,36	0,1229818 ns
		SHB (in mm*min)	-0,77	-3,18	1,64	0,7249983 ns
		IRB (in mm * min)	-0,65	-2,54	1,24	0,8141968 ns

**Tabelle 21: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 3 verglichen mit der Kontrollgruppe; P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant**

Kontrast	Gemessener Parameter	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 4-Kontrollgruppe	Maximum	Grad (in Grad)	-0,06	-0,36	0,25	1 ns
		AKfb (Anteil Oberfläche)	0,03	-0,09	0,14	0,617975 ns
		SHB (in mm)	0,01	-0,03	0,05	1 ns
		IRB (in mm)	-0,01	-0,06	0,04	1 ns
	Maximale Anzahl von Grad	2+3	-0,05	-0,86	0,75	1 ns
		3	2,19	-5,53	9,91	1 ns
	AUC	2+3 (in min)	-1,78	-17,5	13,94	1 ns
		Grad (in Grad*min)	-6,66	-12,78	-0,53	0,0682941 ns
		AKFB (Anteil Oberfläche *min)	-0,11	-2,3	2,08	1 ns
		SHB (in mm*min)	-0,57	-2,3	1,16	1 ns

**Tabelle 22: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 4 verglichen mit der Kontrollgruppe, P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant**

Kontrast	Gemessener Parameter	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 5-Kontrollgruppe	Maximum	Grad (in Grad)	0,44	0,1	0,79	0,0694234 ns
		AKfb (Anteil Oberfläche)	0,13	0	0,26	0,0980732 ns
		SHB (in mm)	0,05	0,01	0,08	0,0076568 **
		IRB (in mm)	0,07	0,03	0,11	0,0021734 **
	Maximale Anzahl von Grad	2+3	0,91	0,13	1,7	0,0955122 ns
		3	0,47	-0,15	1,08	0,2607965 ns
	Frühestes Auftreten von Grad	2+3 (in min)	-7,45	-14,31	-0,6	0,1024947 ns
		3 (in min)	5,64	-5,58	16,86	0,2972209 ns
		Grad (in Grad*min)	19,04	6,66	31,43	0,0226941 *
		AKFB (Anteil Oberfläche *min)	5,32	-0,86	11,51	0,0980732 ns
		SHB (in mm*min)	3,58	1,59	5,57	0,0018483 **
		IRB (in mm * min)	3,25	1,79	4,71	0,0001638 ***

**Tabelle 23: Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 5 verglichen mit der Kontrollgruppe, P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant**

## nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Kontrast	Gemessener Parameter	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
Gruppe 6-Kontrollgruppe	Maximum	Grad (in Grad)	0,73	0,35	1,11	0,0021404 **
		AKFB (Anteil Oberfläche)	0,17	0,04	0,31	0,0145484 *
		SHB (in mm)	0,13	0,09	0,18	0,0000018 ***
		IRB (in mm)	0,16	0,11	0,21	0,0000009 ***
	Maximale Anzahl von Grad	2+3	1,25	0,49	2,02	0,0043581 **
		3	1,45	0,7	2,2	0,0021604 **
	Frühstes Auftreten von Grad	2+3 (in min)	-11,07	-17,05	-5,08	0,0021614 **
		3 (in min)	-0,48	-11,71	10,76	0,9284396 ns
		Grad (in Grad*min)	31,04	15,9	46,17	0,0013627 **
		AKFB (Anteil Oberfläche *min)	12,55	5,42	19,67	0,0022967 **
	AUC	SHB (in mm*min)	5,45	3,3	0,6	0,0000143 ***
		IRB (in mm*min)	4,86	3,01	6,72	0,0000087 ***

**Tabelle 24:** Zusammenfassung statistischer Signifikanzen Gruppe 6 verglichen mit der Kontrollgruppe, P-Werte angepasst über die Holm-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Messwert	Kontrast	Gruppe	Differenz	p-Wert	Signifikanz
AUC Schweregrad	W-M	1	-8,61	0,2260212	ns
		2a	-1,23	0,9148787	ns
		2b	7,81	0,4977904	ns
		3	3,75	0,682613	ns
		4	6,37	0,4880768	ns
		5	3,89	0,6712004	ns
		6	3,04	0,7448144	ns
AUC AKfB	W-M	1	-3,61	0,2801982	ns
		2a	0,84	0,877126	ns
		2b	1,99	0,7136957	ns
		3	1,08	0,802	ns
		4	1,9	0,6603179	ns
		5	1,86	0,6666242	ns
		6	1,79	0,6829878	ns
AUC SHB	W-M	1	-0,87	0,3935709	ns
		2a	-0,18	0,9137373	ns
		2b	0,24	0,8839416	ns
		3	0,84	0,549196	ns
		4	-1,12	0,3950918	ns
		5	0,6	0,6553642	ns
		6	0,61	0,6497431	ns

**Tabelle 25:** Zusammenfassung p-Werte Vergleich weiblicher (=W) und männlicher (=M) Tiere, ns= nicht signifikant

Kontrast	Differenz des durchschnittlichen Linsendurchmesser (in mm)	Unteres KI	Oberes KI	P-Werte (ad)	Signifikanz
1- 2(OD)	-0,00029	-0,0006	0,00002	0,0743261	ns
2a (OS)-2a(OD)	0,00012	-0,00029	0,00053	0,9070297	ns
2b (OS)-2b(OD)	-0,00022	-0,00064	0,00019	0,5512023	ns
3 - Kontrollgruppe	-0,00007	-0,00038	0,00024	0,9490495	ns
4 - Kontrollgruppe	-0,00014	-0,00044	0,00017	0,6913572	ns
5 - Kontrollgruppe	-0,00012	-0,00043	0,00019	0,7913434	ns
6 - Kontrollgruppe	-0,00014	-0,00045	0,00016	0,6729036	ns

**Tabelle 26:** Vergleich der Linsendurchmesserveränderung verschiedener Gruppen mit der Kontrollgruppe, p-Wert angepasst mittels Dunnett-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Kontrast	Differenz der durchschnittlichen Augenkammertiefe (in mm)	Unteres KI	Oberes KI	P-Werte (ad)	Signifikanz
1- 2(OD)	-0,00076	-0,00126	-0,00026	0,0005105	***
2a (OS)-2a(OD)	-0,0005	-0,00096	0	0,0505865	ns
2b (OS)-2b(OD)	0,00068	0,0002	0,00116	0,0015432	**
3 - Kontrollgruppe	0,00005	-0,00049	0,0006	0,996828	ns
4 - Kontrollgruppe	0,00016	-0,00038	0,0007	0,9014368	ns
5 - Kontrollgruppe	-0,00069	-0,00123	-0,00015	0,004877	**
6 - Kontrollgruppe	-0,00071	-0,00125	-0,00017	0,00395	**

**Tabelle 27:** Vergleich der Augenkammertiefenveränderung verschiedener Gruppen mit der Kontrollgruppe, p-Wert angepasst mittels Dunnett-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Kontrast	Differenz	Unteres KI	Oberes KI	p-Wert	Signifikanz
1- 2(OD)	-0,00026	-0,00063	0,00011	0,2997859	ns
2a (OS)-(OD)	0,00234	0,00195	0,00274	0	***
2b (OS)-(OD)	0,0002	-0,0002	0,00059	0,6265986	ns
3 - Kontrollgruppe	-0,00001	-0,0004	0,00038	0,9999599	ns
4 - Kontrollgruppe	-0,00001	-0,0004	0,00038	0,9999556	ns
5 - Kontrollgruppe	0,00013	-0,00026	0,00052	0,8656014	ns
6 - Kontrollgruppe	0,00002	-0,00037	0,00041	0,9997482	ns

**Tabelle 28:** Vergleich der Corneadickenveränderung verschiedener Gruppen, P-Wert angepasst mittels Dunnett-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Kontrast	Differenz der durchschnittlichen Mydriasis (in mm)	Unteres KI	Oberes KI	P-Werte (ad)	Signifikanz
1- 2 (OD)	-0,013	-0,07	0,044	0,9508376	ns
2a (OS)-(OD)	0,169	0,134	0,204	0	***
2b (OS)-(OD)	0,038	0,003	0,074	0,0261521	*
3 - Kontrollgruppe	0,066	0,001	0,131	0,0425941	*
4 - Kontrollgruppe	0,035	-0,03	0,1	0,5260494	ns
5 - Kontrollgruppe	0,313	0,248	0,377	0	***
6 - Kontrollgruppe	-0,055	-0,12	0,01	0,1304419	ns

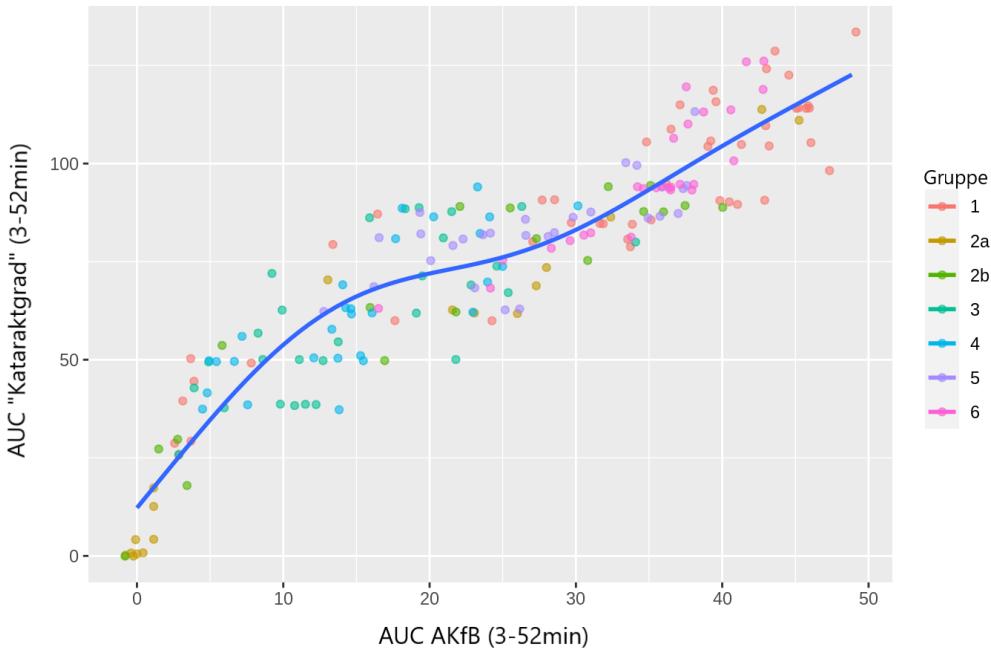
**Tabelle 29:** Vergleich der durchschnittlichen Pupillenweite (in mm) gegen die Kontrollgruppe; P-Werte korrigiert mittels Dunnett-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

Kontrast	Durchschnittliche Differenz AUC Schwerograd nach Beenden der Anästhesie	Unteres KI	Oberes KI	P-Wert	Signifikanz
2a (OS) - (OD)	-25,44	-54,65	3,76	0,109347	ns
2b (OS) - (OD)	-18,19	-61,12	24,74	0,646618	ns
3- Kontrollgruppe	-13,27	-42,06	15,52	0,632193	ns
4- Kontrollgruppe	32,72	7,01	58,43	0,007964	**
5- Kontrollgruppe	-41,24	-64,61	-17,87	0,00034	***
6- Kontrollgruppe	-7,41	-34,96	20,15	0,901844	ns

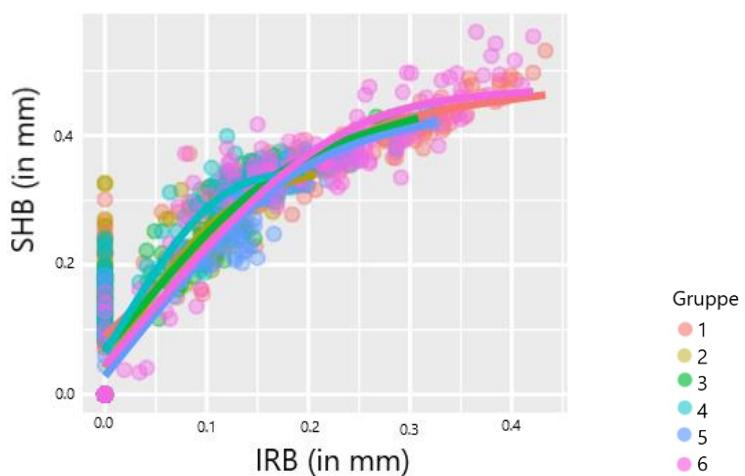
**Tabelle 30:** Vergleich der Kataraktreversibilität (AUC-Werte Kataraktgrade nach Beenden der Anästhesie) gegen die Kontrollgruppe; P-Werte korrigiert mittels Dunnett-Methode; Unteres/Oberes KI = Obere/Untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant

## 9.5. Korrelation verschiedener Parameter

### 9.5.1. Anhang 5.1

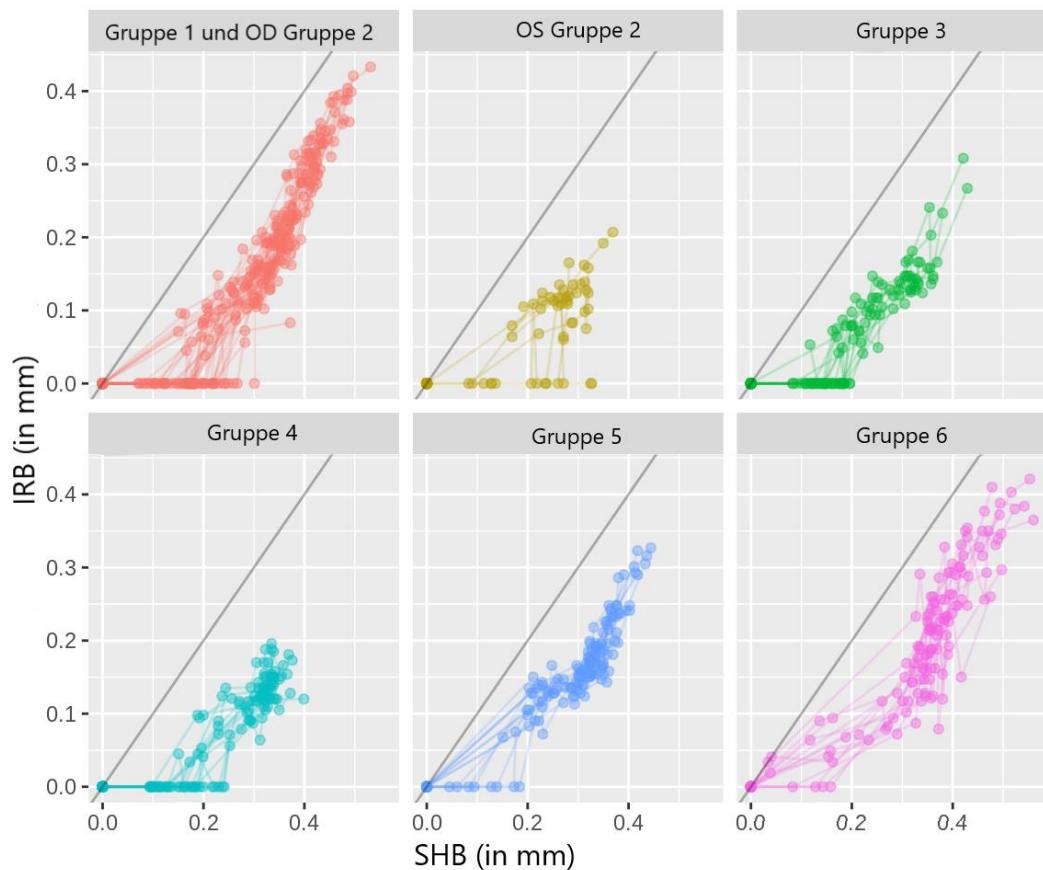


**Abbildung 83:** Korrelation zwischen den AUC-Werten der Kataraktgraduierung und AKfB (Daten von allen Gruppen)

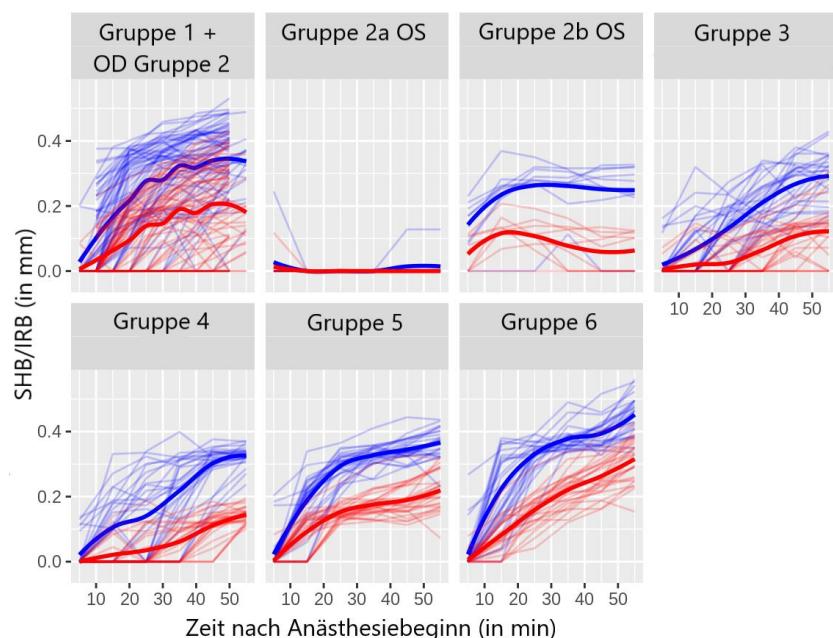


**Abbildung 84:** Gruppenübergreifende Korrelation der beiden Messgrößen

## SHB und IRB

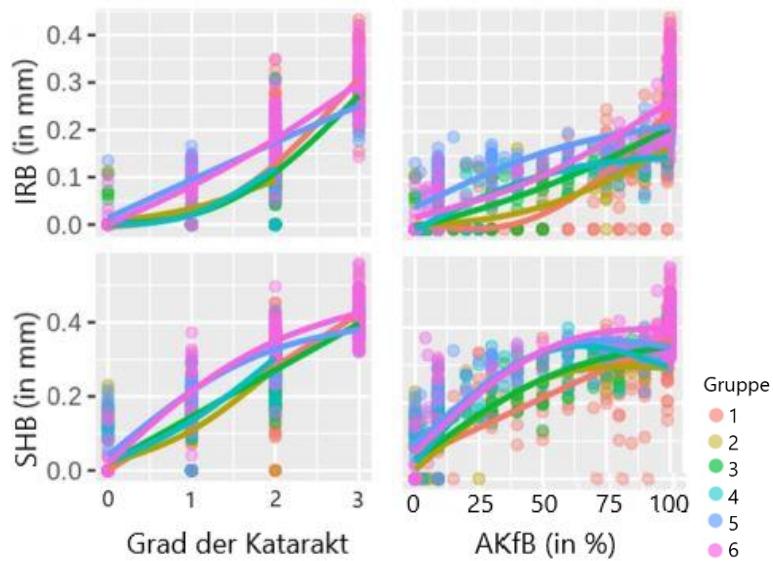


**Abbildung 85:** Korrelation der Messgrößen SHB und IRB aufgeteilt in die einzelnen Gruppen



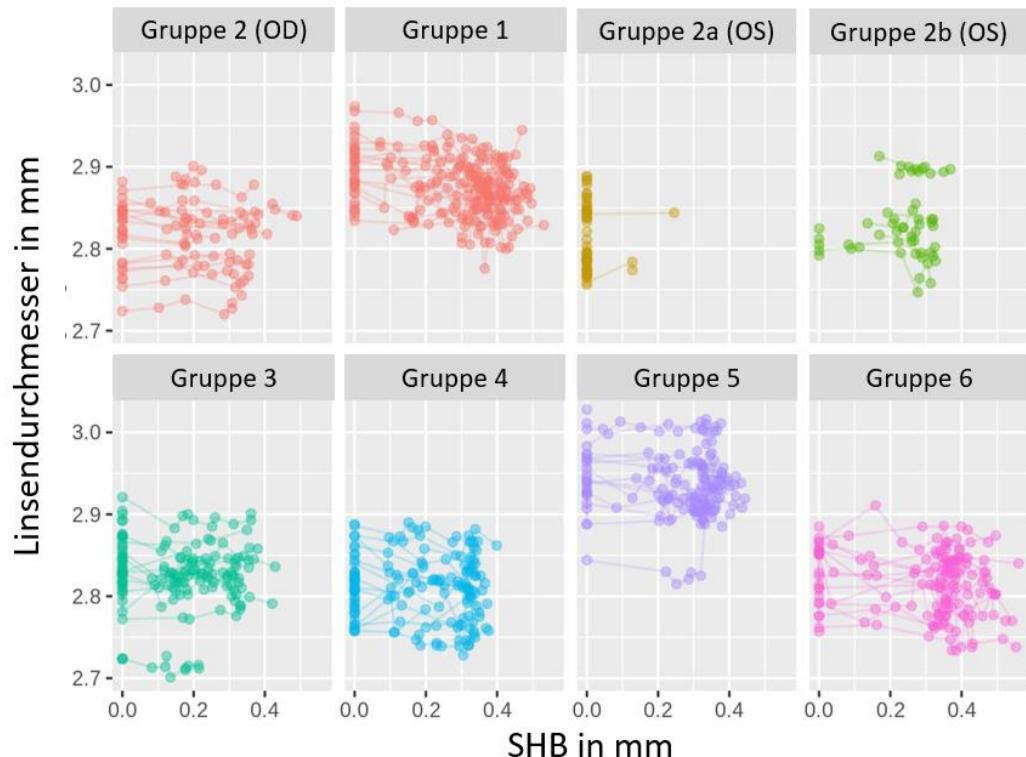
**Abbildung 86:** SHB und IRB im zeitlichen Verlauf der Anästhesie, Rot= IRB,

**Blau= SHB**



**Abbildung 87: Korrelation SHB und IRB mit Grad und AKfB**

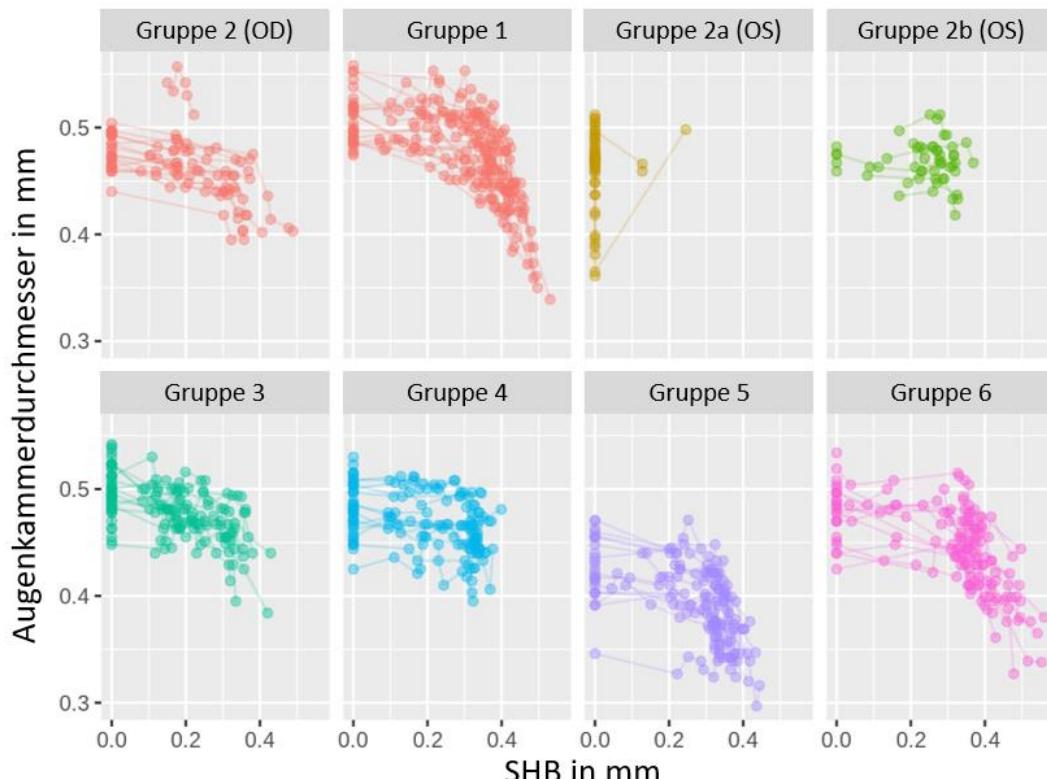
### 9.5.2. Anhang 5.2



**Abbildung 88 Korrelation zwischen Linsendurchmesser und SHB (Alle Zeitpunkte)**

Gruppe	Trendwert der linearen Korrelation zwischen Linsendurchmesser und SHB	P-Wert	Signifikanz
1	-0,04928	0	***
2 (OD)	-0,00601	0,6291471	ns
2b (OS)	-0,00871	0,7595528	ns
3	-0,01348	0,2292858	ns
4	-0,02641	0,0074854	**
5	-0,02203	0,0282953	*
6	-0,03471	0,0000433	***

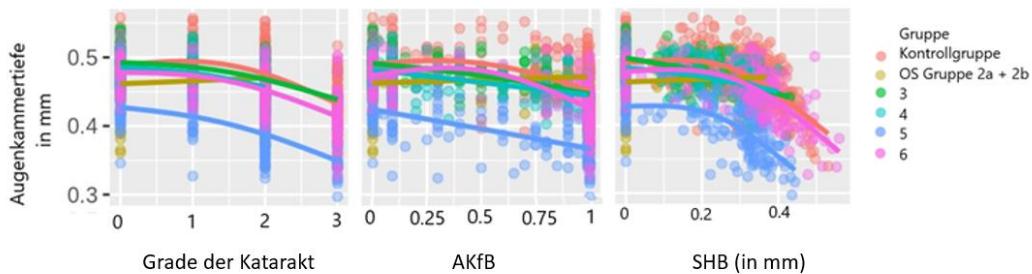
**Tabelle 31 Signifikanz der linearen Korrelation zwischen Linsendurchmesser und SHB getestet gegen die Nullhypothese von keiner linearen Veränderung; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**



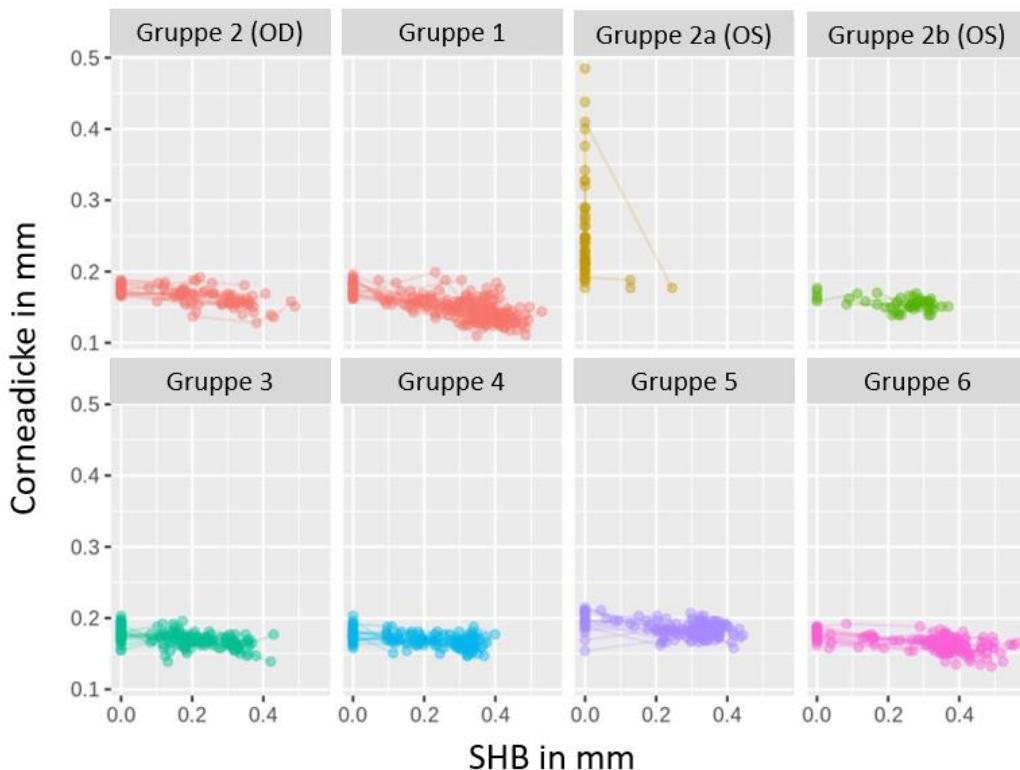
**Abbildung 89: Verhältnis zwischen SHB und Tiefe Augenkammer (Alle Zeitpunkte)**

Gruppe	Trendwert der linearen Korrelation zwischen Augenkammertiefe und SHB	P-Wert	Signifikanz
1	-0,09932	0	***
2 (OD)	-0,20156	0	***
2b (OS)	0,0118	0,7138618	ns
3	-0,09832	0	***
4	-0,0757	0	***
5	-0,169	0	***
6	-0,14211	0	***

**Tabelle 32: Signifikanz der linearen Korrelation zwischen Augenkammertiefe und SHB getestet gegen die Nullhypothese von keiner linearen Veränderung; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**



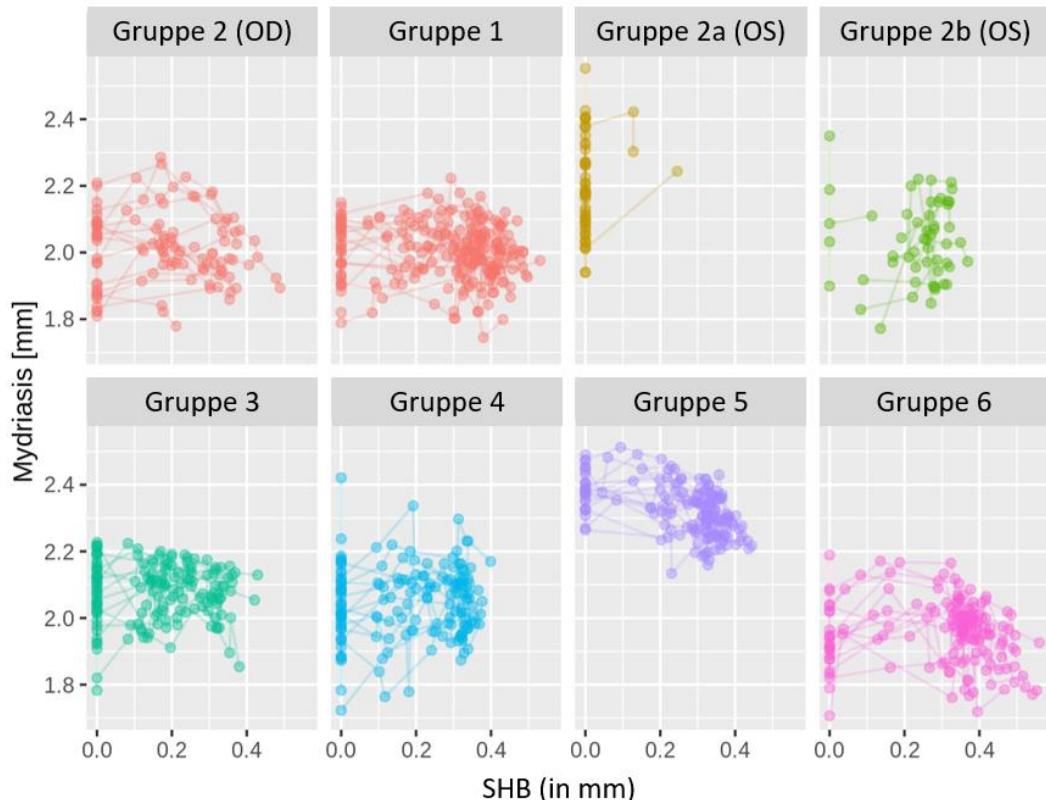
**Abbildung 90 Darstellung Abnahme Augenkammertiefe mit Zunahme Grad/AKfB/SHB**



**Abbildung 91: Korrelation zwischen Corneadieke und SHB (Alle Zeitpunkte)**

Gruppe	Trendwert der linearen Korrelation der Corneadieke und SHB	p-Wert	Signifikanz
1	-0,08766	0	***
2 (OD)	-0,07967	0	***
2b (OS)	-0,05164	0,0518792	ns
3	-0,04849	0,0000087	***
4	-0,03885	0,0000568	***
5	-0,03444	0,0005243	***
6	-0,04053	0,0000013	***

**Tabelle 33: Signifikanz der linearen Korrelation zwischen Cornea und SHB getestet gegen die Nullhypothese von keiner linearen Veränderung; ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**



**Abbildung 92: Verhältnis zwischen SHB (x-Achse) und Pupillenweite (Y-Achse) aller Messzeitpunkte**

Gruppe	Trendwert der linearen Korrelation zwischen Mydriasis und SHB	P-Wert	Signifikanz
1	0.06555	0.2403590	ns
2 (OD)	-0.03679	0.3360546	ns
2b (OS)	-0.21827	0.0847394	ns
3	-0.00241	0.9619797	ns
4	0.12429	0.0053282	**
5	-0.27555	0	***
6	-0.05894	0.1242115	ns

**Tabelle 34: Signifikanz der linearen Korrelation zwischen Mydriasis und SHB, ns= nicht signifikant, \*-\*\*\* signifikant**



## **10. Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, seine freundliche Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Mein Dank gilt des Weiteren meiner Mentorin Frau Dr. Nora Denk, die diese Studie ins Leben rief und mir dieses interessante und wichtige Thema überliess. Ihr möchte ich danken für ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und Zeit – vor allem auch in stressigen Situationen - und das Vermitteln ihrer ophthalmologischen Fachkenntnisse. Ohne ihre fachliche Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Promotion wäre die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Guido Steiner, welcher mich bei der statistischen Auswertung unterstützte.

Bei Frau Christine Seeger möchte ich mich besonders für ihre Hilfe bei der Organisation und praktischen Durchführung der Versuche und ihre seelisch-moralische Unterstützung bedanken.

Der Firma F. Hoffmann - La Roche Ltd möchte ich für die finanzielle und materielle Unterstützung dieser Studie danken.

Ein ganz grosses, besonderes Danke verdienen meine Eltern Petra und Lothar Klausmann, meine Schwester Kim Klausmann und mein Freund Marc Mattei für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre immerwährende Unterstützung. Ihr habt mich auf dem langen Weg vom Beginn meiner Ausbildung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit immer in allen Bereichen unterstützt, mich in schwierigen Zeiten aufgebaut und mir ermöglicht meine Ziele zu erreichen.