

Aus der Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
(Direktor: Prof. Dr. B. Seitz)

**VERGLEICH VON OPTISOLTM-GS UND MEDIUM I DER FIRMA
BIOCHROM ALS TRANSPORT- UND KULTURMEDIUM VOR DER
ORGANKULTUR VON HORNHÄUTEN**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin**
der
medizinischen Fakultät
der
Universität des Saarlandes

2 0 0 7

vorgelegt von
Attila Osvald,
geboren am 27.08.1969 in Bratislava

meiner Frau Katharina
und meinem Sohn Oscar-Maximilian
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
1. Zusammenfassung	4
1.1. Zusammenfassung	4
1.2. Summary	5
2. Einleitung	6
2.1. Geschichte zur Entwicklung der Kultivierung von Hornhäuten.....	6
2.1.1. Transplantatkonservierung	6
2.1.2. Cold Storage oder Kurzzeitkonservierung	7
2.1.3. Organkultur	8
2.1.4. Kryokonservierung.....	9
2.1.5. Weitere Konservierungsmethoden.....	10
2.1.6. Ziel der Organkultur von Transplantaten.....	10
2.1.7. Aufgaben einer Hornhautbank	11
2.2. Die penetrierende Keratoplastik.....	11
2.3. Zielsetzung und Fragestellung.....	13
3. Material und Methodik.....	14
3.1. Entnahme der Corneoskleralscheibe	14
3.2. Transport und Lagerung	15
3.3. Messung der Endothelzellzahl	16
3.4. Zielgrößen.....	18
3.5. Datenerfassung und Auswertung.....	18
4. Ergebnisse	20
4.1. Entnahme und Kultivierung der Corneoskleralscheibe	20
4.2. Transport und Lagerung	21
4.3. Messung der Endothelzellzahl	22
5. Diskussion	25
6. Praktische Schlussfolgerung und Ausblick	27
7. Literaturverzeichnis.....	29
8. Dank	34
9. Lebenslauf	35

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Zusammenfassung

Hintergrund: Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Corneoskleralscheiben vor der eigentlichen in Kulturnahme zu transportieren und aufzubewahren. Nach wie vor werden sowohl „Coldstorage“-Medien wie Optisol™-GS oder die später auch zur Organkultur verwendeten Medien benutzt. In dieser Studie wird der Endothelzellverlust während der Organkultur in Abhängigkeit von dem verwendeten Transportmedium verglichen.

Material und Methode: Von 144 Corneoskleralscheiben (72 Spender) wurde jeweils eine in Optisol™-GS und die Gegenseite in Medium I der Firma Biochrom gegeben. Diese Corneoskleralscheiben wurden dann bis zur in Kulturnahme im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die anschließende Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 34,4°C. Zur Kultur wurden die Medien I+II der Firma Biochrom unter Zusatz von fetalem Kälberserum verwendet. Als Maß für die Güte der Hornhäute wurde die jeweilige Entwicklung der Endothelzellzahl im Laufe der Zellkultur gewertet. Die Messung der Endothelzellzahl erfolgte erstmalig sieben Tage nach in Kulturnahme, die zweite Zählung wurde am Transplantationstag nach einem Abstand von 6,5 bis 24,5 Tagen durchgeführt. Um die unterschiedliche Kultivierungsdauer der jeweiligen Transplantate zu berücksichtigen, wurde der Endothelzellverlust, zwischen den beiden Zählungen pro Tag berechnet.

Ergebnisse: Es konnte bezüglich des Endothelzellverlustes pro Tag Kultivierungszeit zwischen den beiden Zählungen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lagerung in den beiden Transportmedien nachgewiesen werden. In Optisol™-GS verloren die Hornhäute durchschnittlich 10,6 Zellen pro Tag (SD = 7,2) während der Verlust in Medium I 11,3 Zellen pro Tag (SD = 8,2) betrug ($P= 0,75$). Auch bei Hornhäuten, die länger als 24 Stunden bei 4°C gelagert wurden, konnte kein Unterschied im Endothelzellverlust festgestellt werden.

Schlussfolgerungen: Die Aufbewahrung von Corneoskleralscheiben zur Transplantation in Optisol™-GS vor der eigentlichen Organkultur scheint auch bei längerer Lagerung bei kalten Temperaturen bezüglich des Endothelzellverlustes keinen Vorteil gegenüber der wesentlich günstigeren Lagerung in Medium I zu bringen.

1.2. Summary

Is it beneficial to store cornea transplants in Optisol™-GS before organ culture?

Purpose: For transport and storage donated corneas before organ culture may be preserved in medium I, which is also used for organ culture later on. Alternatively, corneal discs can be kept in the cold storage medium Optisol™-GS. The purpose of this study was to assess whether exposing the corneal discs to Optisol™-GS before organ culture would be beneficial with respect to preserving tissue quality as determined by the number of endothelial cells during cultivation.

Methods: One of the two sclerocorneal discs of each of 72 donors (144 eyes) was placed into Optisol™-GS or Medium I, respectively, and kept at 4°C until regular cultivation at 34.4°C. Medium I and II (Biochrom, Inc. Berlin) with added fetal calf serum were used for cultivating the specimen. Endothelial cell count was performed in a time course to assess the quality of the respective corneal tissues. The first reading was performed at day 7 of cultivation and the second at the day of keratoplasty 6,5 to 24,5 days later. The loss of endothelial cells per day was calculated to account for the variability in cultivation time.

Results: With respect to endothelial cell loss per day during the complete cultivation period the two storage media did not perform significantly different ($P=0.75$) with a average loss of 10,6 cells per day for Optisol™-GS (SD = 7,2) and a decrease of 11,3 cells per day for Medium I (SD = 8,2). In addition, corneal discs that were kept at 4°C for a period of 24 hours or more did not show differences in endothelial cell loss.

Conclusions: Extended storage of sclerocorneal discs in Optisol™-GS at low temperatures does not appear to provide particular benefits over storage in Medium I regarding endothelial cell loss.

2. EINLEITUNG

2.1. Geschichte zur Entwicklung der Kultivierung von Hornhäuten

2.1.1. Transplantatkonservierung

Erste Untersuchungen zur möglichen Lebensfähigkeit von Hornhauttransplantaten in speziellen Kulturmedien wurden schon am Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Magitot²⁴ bewies 1911 tierexperimentell, dass die Erhaltung der Transplantatvitalität in 2 bis 10°C kaltem hämolysierten Blut möglich ist. Neben dem konservierenden Serum erkannte man den entscheidenden Einfluss der Temperatur auf den Erhalt der Gewebevitalität. Reim³² zeigte 1967 anhand von experimentellen Untersuchungen, dass das enukleierte Auge bzw. dessen Endothel bei einer Temperatur von 37°C 6 Stunden überlebt. Bei Herabsetzung der Temperatur verlangsamt sich der Prozess der Nekrose, so dass bei einer Temperatur von 7°C das Transplantat bis zu 48 Stunden post mortem verwendbar ist. Nach Reim konnte die Überlebenszeit durch weitere Reduzierung unter der Temperatur unter 7°C nicht verlängert werden. Der Erste, der die Hornhäute Verstorbener zur Transplantation einsetzte, war in den dreißiger Jahren Filatov¹³. Er bewahrte die Bulbi in einer feuchten Kammer im Kühlschrank auf und konnte so Hornhauttransplantationen erstmals als geplanten Eingriff durchführen. Die damals akzeptierte Lagerungszeit betrug unter Berücksichtigung der Post-mortem-Zeit zwischen 20 und 56 Stunden.



Abb. 1: Prof. Dr. V. P. Filatov
(Foto Homepage Filatov Institute)
http://filatovinstitute.tripod.com/frame_e.htm

Man kann frisch entnommene, kurzzeitkonservierte und langzeitorgankultivierte Hornhäute transplantieren. Die heutzutage gängigsten Methoden der Hornhautkonservierung sind die Kurzzeitkonservierung und die Organkultur. Ein weiteres Verfahren ist die Kryokonservierung, die zur Zeit aber nur eine untergeordnete Rolle in der Aufbewahrung von Hornhäuten spielt.

2.1.2. Cold Storage oder Kurzzeitkonservierung

Die Kurzzeitkonservierung bei 4°C, die das Transplantat für 4 Tage überlebensfähig machte, entwickelten McCarey/Kaufmann²⁶ 1974. Nach leichten Modifikationen ist diese Methode wegen ihrer einfachen Anwendbarkeit die noch heute am weitesten verbreitete Form der Transplantatkonservierung in der klinischen Routine (Bigar⁴, Böhnke⁵), vor allem in den USA. In Europa dominiert eher die Organkultur. Auch in Deutschland gibt es Hornhautbanken, die einen Teil Ihrer Hornhäute nur im Kühlschrank lagert. Das Medium, das zur Kurzzeitkonservierung verwendet wird, besteht aus Medium TC 199 (Morgan²⁷), Dextran 5%, Penicillin und Streptomycin. Kaufmann entwickelte später auch noch das Medium K-Sol²², in dem die Aufbewahrungsdauer bis auf 10 Tage ausgedehnt werden konnte.

Bei den heute gängigen Konservierungsmedien wie DexsolTM (Chiron Vision Corporation, Irvine, CA, USA), OptisolTM und OptisolTM-GS (Bausch & Lomb Surgical, Irvine, CA, USA) wurde das Grundmedium TC 199 teilweise oder völlig durch MEM (Minimum Essential Medium) ersetzt, da dadurch ein deutlich geringerer Zellverlust während der Lagerung auftrat¹⁴. Außerdem wurden Antioxidantien als Gewebeprotektoren, nichtessentielle Aminosäuren und Vitamine zur besseren Versorgung der Hornhäute zugesetzt. OptisolTM enthält gegenüber DexsolTM noch die stoffwechselaktiven Substanzen Adenosin, Inosin und Vitamin B₁₂, wodurch deutlich weniger morphologische Veränderungen, vor allem bei einer Kulturdauer bei 4°C von bis zu 14 Tagen auftraten²¹. Um das Risiko einer Endophthalmitis nach Keratoplastik zu reduzieren, wurde OptisolTM-GS noch durch den Zusatz von Streptomycin ergänzt. Alle Medien zeigen pH-Wert-Änderungen, die ein Anzeichen für eine Kontamination sein kann, durch eine Farbänderung an. Die Zusammensetzung der verschiedenen Hornhautkonservierungslösungen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hornhautkonservierungslösungen

Dexsol™			
MEM		Natriumpyruvat	1 mM
HEPES-Puffer und Bikarbonat		Gentamicinsulfat	100 µg/ml
Dextran 40	1 %	Antioxidantien	
Chondroitinsulfat	1,35 %	Phenolrot	
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM		
Optisol™			
MEM/TC 199		Ascorbinsäure u.a. Antioxidantien	
HEPES-Puffer und Bikarbonat		Vitamin B ₁₂	
Dextran 40	1 %	ATP-Vorstufen	
Chondroitinsulfat	2,5 %	Gentamicinsulfat	100 µg/ml
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM	Phenolrot	
Natriumpyruvat	1 mM		
Optisol™-GS			
MEM/TC 199		Ascorbinsäure u.a. Antioxidantien	
HEPES-Puffer und Bikarbonat		Vitamin B ₁₂	
Dextran 40	1 %	ATP-Vorstufen	
Chondroitinsulfat	2,5 %	Gentamicinsulfat	100 µg/ml
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM	Streptomycinsulfat	200 µg/ml
Natriumpyruvat	1 mM	Phenolrot	

Aus Gareiß-Lok A., Wilhelm F.W.: Lagerung in flüssigen Medien bei + 4°C. In Wilhelm F.W., Duncker G.I.W., Bredehorn T. (Hrsg.), *Augenbanken*, Walter De Gruyter Berlin/New York 2002, S. 101

2.1.3. Organkultur

In den siebziger Jahren berichteten Summerlin³⁸, Doughman¹⁰ und Lindstrom²³ über eine Methode zur Langzeitkultivierung von bis zu 6 Wochen. Das Medium dieser Organkultur besteht aus Eagle's Minimum Essential Medium, fetalem Kälberserum, Antibiotika und Antimykotika, insgesamt aus über 20 Einzelbestandteilen (Tab. 2). Diese erfolgreiche Methode hat mittlerweile in Europa weite Verbreitung erfahren.

Sperling³⁷ mit seinen klinischen Studien war sicher einer der Wegbereiter des Organkulturverfahrens in Europa. Pels und Schuchard²⁹ gründeten in Amsterdam eine der ersten Hornhautbanken in Europa und Böhnke⁶ war es, der 1981 die erste deutsche Hornhautbank in Hamburg eröffnete. Weitere Hornhautbanken, die das Organkulturverfahren nutzten, folgten in Aachen (1989), Kiel (1991) und Greifswald (1992).

Tabelle 2: Zusammensetzung des MEM-Earle-Mediums

Earle's Salze			
NaCl	6800	KCl	400
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	140	MgSO ₄ *7H ₂ O	200
CaCl ₂	200	D-Glukose	1000
Phenolrot	10		
MEM (Minimal Essential Medium)			
L-Arginin*HCl	126	L-Cystein	24
L-Histidin*HCl*H ₂ O	42	L-Isoleucin	52
L-Lysin*HCl	73	L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32	L-Threonin	48
L-Tryptophan	10	L-Tyrosin	36
DL-Valin	46	Folsäure	1
Cholinchlorid	1	Nicotinamid	1
D-Ca-Pantothenat	1	Pyridoxal*HCl	1
Riboflavin	0,1	i-Inositol	2

Aus Gareiß-Lok A., Wilhelm F.W.: Lagerung in flüssigen Medien bei + 4°C. In Wilhelm F.W., Duncker G.I.W., Bredehorn T. (Hrsg.), **Augenbanken**, Walter De Gruyter Berlin/New York 2002, S. 99

2.1.4. Kryokonservierung

Den eben genannten Konservierungsmöglichkeiten steht seit langem die Kryokonservierung der Transplantate gegenüber. Es handelt sich hierbei um eine Langzeitkonservierung, die das Spendergewebe über Jahre verwertbar halten soll. Mathieu²⁵ berichtete 1985 über gute klinische Resultate nach der Transplantation kryokonservierter Hornhäute. Trotzdem hat sich diese Methode nicht durchgesetzt, da durch Einfrieren und Auftauen bei einigen Transplantaten unkalkulierbare Endothelzellschäden auftraten, oder es zu einer starken Reduktion der Endothelzelldichte kam (Brunette⁷, Halberstadt¹⁷).

2.1.5. Weitere Konservierungsmethoden

Außer den bisher aufgezählten Konservierungsmethoden wurden noch weitere Varianten getestet. Katzin²⁰ versuchte mittels einer Art von Gefriertrocknung eine Konservierung zu erreichen. Urrets-Zavalía⁴⁰ hingegen trocknete die Transplantate aus und hoffte so, das Spendergewebe konservieren zu können. Burki⁸ wiederum bettete das Gewebe in Paraffin ein in der Hoffnung, den Zelluntergang dadurch hinauszuzögern. All diese Methoden sind heute als historisch anzusehen.

2.1.6. Ziel der Organkultur von Transplantaten

Ziel des Konservierungsverfahrens ist es, ausreichend Zeit zur Verfügung zu haben, um den Operationszeitpunkt optimal zu organisieren und durch eine HLA-Typisierung bzw. ein HLA-Matching die Inzidenz von Abstoßungsreaktionen zu reduzieren.

Die Keratoplastik unterliegt den gleichen gesetzlichen Qualitätssicherungsvorschriften des Transplantationsgesetzes wie die Transplantation parenchymatöser Organe. Die Langzeitkulturverfahren sind die Methoden der Wahl, da sie die Qualitätssicherungsvorschriften eindeutig am besten erfüllen⁴¹. Bis die geforderten virusserologischen Befunde (HbsAg, Anti-HCV, Hepatitis-C-Virus-RNA, HIV-1/2-Antikörper) komplett und verlässlich vorliegen, vergeht ungefähr 1 Woche. Nicht selten müssen die Laboruntersuchungsergebnisse wegen der besonderen Schwierigkeiten der Bestimmung aus Leichenblut wiederholt oder ergänzt werden, was erneut Zeit kostet. Zusätzlich gibt es noch einen zweiten zeitaufwendigen Faktor, nämlich die Gewebe-Typisierung und das Matching⁴⁰. Derzeit sind die Chancen auf ein Zero-Mismatch im A, B, DR -Locus, von dem die Hochrisikopatienten besonders profitieren würden, jedoch noch sehr gering, da viel zu wenig typisiertes Gewebe zur Verfügung steht. Nur wenn man möglichst alle Hornhäute typisiert und dadurch einen viel effizienteren Austausch HLA-typisierter Hornhäute z.B. über BIS (Bioimplant Services Leiden, Niederlande) ermöglicht, steigen die Chancen auf ein Zero-Mismatch deutlich an.

Hinreichende Zeit für alle genannten Untersuchungen gewährt nur die Langzeit-Organkultur. Deshalb hat sich die Arbeitsgemeinschaft Deutscher Hornhautbanken entschlossen, Langzeitkulturverfahren zu empfehlen und zu fördern.

Die Langzeit-Organkultur wird befürwortet

- um primär nicht erkennbare mikrobiologische/virologische Kontaminationen aufzudecken.
- weil mit der Zeit (ca. 14 Tage) die HLA-DR-positiven Langerhans-Zellen das Transplantat verlassen und damit seine immunologische Verträglichkeit besser wird^{1,19}
- um die Vitalität des Spenderendothels verlässlicher abschätzen zu können.
- um Transplantat und Spender in einem großräumigen Versorgungsgebiet optimal zusammenzuführen.

2.1.7. Aufgaben einer Hornhautbank

Die Hornhautbank hat im Wesentlichen folgende Aufgaben :

- Die Auswahl der potentiellen Hornhautspender: Hierbei spielen unter anderem morphologische Kriterien, Vorerkrankungen der Augen und mögliche System- oder Infektionskrankheiten des Spenders eine Rolle.
- Das Einwilligungsgespräch und gesetzliche Grundlagen: Die Mitarbeiter der Hornhautbank müssen die Zustimmung der nächsten Angehörigen eines potentiellen Spenders einholen und dieses Gespräch sowie die Entscheidung des befragten Angehörigen dokumentieren.
- Entnahme, Präparation und Lagerung der Hornhäute.
- Verteilung an die zu transplantierenden Patienten nach Allokationsregeln.

2.2. Die penetrierende Keratoplastik

Neben der Verpflanzung von Organen wie Niere, Herz oder Leber, ist auch eine Übertragung von Geweben wie Gehörknöchelchen oder der Hornhaut des Auges möglich. Die Hornhaut schließt die Augenoberfläche wie ein Uhrglas ab. Sie ist verhältnismäßig dünn und durchsichtig. Verliert sie ihre Klarheit, gelangt nicht mehr ausreichend Licht in das Auge: Der Betroffene büßt sein Sehvermögen ein und kann

erblinden. Eine Hornhautverpflanzung kann ihm das Augenlicht zurückgeben. Die getrübte Hornhaut wird entfernt und durch die gesunde, klare Hornhaut eines Spenders ersetzt. Eine Trübung der Hornhaut kann viele Ursachen haben. Die häufigsten sind Infektionen, zum Beispiel mit dem Herpesvirus. Aber auch Verletzungen oder angeborene Erkrankungen können eine Trübung der Hornhaut hervorrufen, ebenso können extreme Verdünnungen der Hornhaut eine Transplantation notwendig machen.

Die Hornhauttransplantation ist die erste, häufigste und erfolgreichste Verpflanzung eines Gewebes beim Menschen. Die fremde Hornhaut wird vom menschlichen Organismus jahrzehntelang vertragen. Medikamente, die eine Abstoßung verhindern, müssen nur vorübergehend eingenommen werden, in Einzelfällen ist eine längerfristige Therapie notwendig. Weltweit haben bislang zehntausende Erblindete das Augenlicht durch die Verpflanzung einer Hornhaut zurückerhalten. Eine erfolgreiche Transplantation kann den Patienten das Sehvermögen vollständig wiedererlangen lassen. Sein Alltag verändert sich dann schlagartig: Er kann wieder lesen, seinem Beruf nachgehen, ist frei von Schmerzen. Bei Kindern, bei denen eine angeborene Trübung der Hornhaut besteht, kann eine Hornhaut-Transplantation zudem verhindern, dass sie dauerhaft schwachsichtig werden. Denn eine normale Sehschärfe kann sich nur entwickeln, wenn von Geburt an ausreichend Licht in das Auge gelangt.

Doch längst nicht allen Patienten, die auf eine Hornhaut warten, kann heute geholfen werden. Denn es stehen bei weitem nicht genug Spender zur Verfügung. In Deutschland warten derzeit rund 4500 Patienten³⁹ auf ein Hornhauttransplantat. Sie haben nur eine Chance, wenn mehr Menschen bereit sind, ihre Augenhornhäute nach dem Tod zu spenden.

Bei der eigentlichen Hornhauttransplantation (Keratoplastik) wird dann aus der erkrankten Hornhaut ein Scheibchen von meist 7-8 mm Durchmesser ausgeschnitten und durch eine entsprechende, homologe Spenderhornhaut ersetzt. Neben der Sonderform der lamellären Keratoplastik, bei der nur ein Teil, nämlich die vordere Hornhautlamelle übertragen wird, kommt vorwiegend die Technik der penetrierenden, durchgreifenden Keratoplastik zur Anwendung. Hierbei wird die Hornhaut in ihrer ganzen Dicke übertragen.

Eine mögliche Abstoßung des Transplantats ist denkbar, tritt jedoch über eine Zeitspanne von 10 Jahren bei nur 10% der Patienten²⁸ auf.

Die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation wurde bereits vor ca. 100 Jahren beschrieben⁴². Weltweit ist die Hornhauttransplantation mittlerweile die am häufigsten durchgeführte Transplantation. Allein in Deutschland werden jährlich zwischen 4000 und 5000 Hornhauttransplantationen³⁵ durchgeführt, davon in Homburg ca. 100 pro Jahr. Am 15.07.2003 erfolgte in der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes die 1000. Hornhautverpflanzung seit dem 1.11.1989. Bis zum Jahr 1972 war es üblich, eine nach dem Tod eines Spenders entnommene Hornhaut innerhalb von Stunden bis zu wenigen Tagen direkt zu transplantieren. Heute werden die Hornhautscheiben in so genannten Hornhautbanken von der Entnahme bis zur Transplantation speziell aufbewahrt.

2.3. Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung der vorgelegten Studie war es, den Einfluss der unterschiedlichen Transportmedien als primäre Aufbewahrungslösung auf die Entwicklung der Hornhauttransplantate während der eigentlichen Organkultur darzulegen.

Als Qualitätskriterium hierfür wurde die Endothelzellzahl der Hornhauttransplantate als wichtigster Faktor gewählt. Bisher wurden schon viele Studien zum Vergleich von verschiedenen Konservierungsmethoden oder auch zum Vergleich verschiedener Lösungen gleicher Konservierungsmethoden durchgeführt. Jedoch wird in keiner dieser Studien der Einfluss der Transport- oder Aufbewahrungslösung vor der eigentlichen Konservierungsmethode berücksichtigt. In der vorgelegten Studie soll untersucht werden, ob sich durch zwei verschiedene Transportmedien ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Entwicklung der Endothelzellzahl der Transplantate in der Kultur ergibt.

3. MATERIAL UND METHODIK

Zunächst wird kurz der Ablauf der Transplantatentnahme und der anschließenden Kultivierung dargestellt.

3.1. Entnahme der Corneoskleralscheibe

Bei der Hornhautentnahme ist es essenziell zu versuchen, unter möglichst sterilen Bedingungen zu arbeiten. Deswegen wurde nach der Blutentnahme eine Hautdesinfektion im Augenbereich durchgeführt und der Leichnam mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Nach Einsetzen eines Lidsperrers erfolgte die Desinfektion der Konjunktiva mit einer 1,25-prozentigen PVP-Jod-Lösung, die über die Dauer von 5 Minuten einwirkt. Dann Auswischen der Umschlagfalten mit Zigarrentupfern und eine erneute Spülung mit steriler Kochsalzlösung. Danach wurde die Konjunktiva, da sie physiologischerweise mit einem breiten Spektrum an Mikroorganismen besiedelt ist, am Limbus, dem Übergang von der Sklera zur Cornea, mit einer Schere abgesetzt. Anschließend wurde mit einem Trepan, einem zylindrischen Instrument mit einer kreisrunden Klinge von 15mm Durchmesser an einem Ende, die Sklera kreisrund durchtrennt. Aufgrund der oft schon eingetretenen Bulbushypotonie gelingt die Durchtrennung oft nicht in einem Schritt, und die restlichen Skleraanteile müssen mit einer gebogenen Schere vollständig durchtrennt werden. Die so gewonnene Corneoskleralscheibe kann dann mit einer Pinzette vorsichtig angehoben werden, um gegebenenfalls noch anhaftende Uveaanteile mit dem Hockeymesser (siehe Abb. 2) abzulösen und die Corneoskleralscheibe dann in die Transportlösung einzubringen.

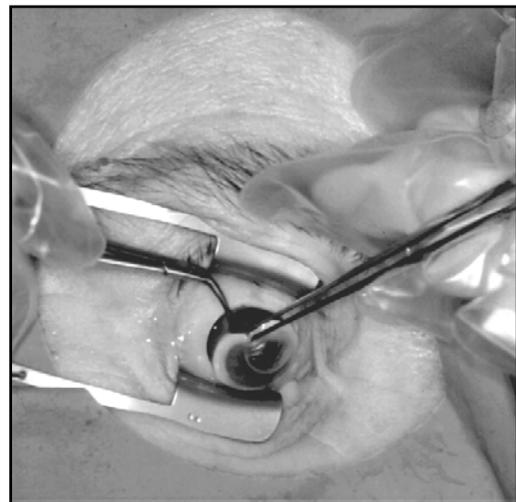


Abb. 2: Entnahme der Corneoskleralscheibe an der Leiche

3.2. Transport und Lagerung

Bei 72 Hornhautspendern wurde die Corneoskleralscheibe entweder des rechten oder des linken Auges in Optisol™-GS (Abb. 3) und die der Gegenseite in Medium I der Firma Biochrom eingebracht und so in die Hornhautbank transportiert. Die Corneoskleralscheiben wurden dann in den jeweiligen Transportmedien im Kühlschrank bis zur in Kulturnahme bei 4°C gelagert. Nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer der jeweiligen Spenderscheibenpärchen wurden die Corneoskleralscheiben aus dem Kühlschrank unter einer sterilen Werkbank in die Kulturlösung Medium



Abb. 3: Entnahme der Corneoskleralscheibe

I der Firma Biochrom mit dem Zusatz von fetalem Kälberserum, eingebracht. In der Abbildung 4 sind die Corneoskleralscheiben im Kulturmedium im Organkulturschrank zu sehen. Die Fixation in den Kulturfläschchen erfolgt mittels „Böhnke“-Haltern, um weitere mechanische Schädigungen während der Organkultur zu vermeiden.

Kulturmedium I der Firma Biochrom wird aus folgenden Zutaten hergestellt.

MEM-Earle's	100,00 ml
Penicillin/Streptomycin	10,00 ml
L-Glutamin (200mM)	10,00 ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	10,00 ml
Hepes Puffer (1M) (50x)	12,50 ml
NaHCO ₃	29,30 ml
Aqua dest., steril	ad 1000,00 ml
PH-Wert: 7,2-7,3	

Kulturmedium II enthält zusätzlich zu den oben genannten Zutaten pro 1000 ml Medium 60g Dextran 500.

2 ml Fetales Kälberserum der Firma Biochrom KG, Berlin wird jeweils unmittelbar vor Kultur zugesetzt.

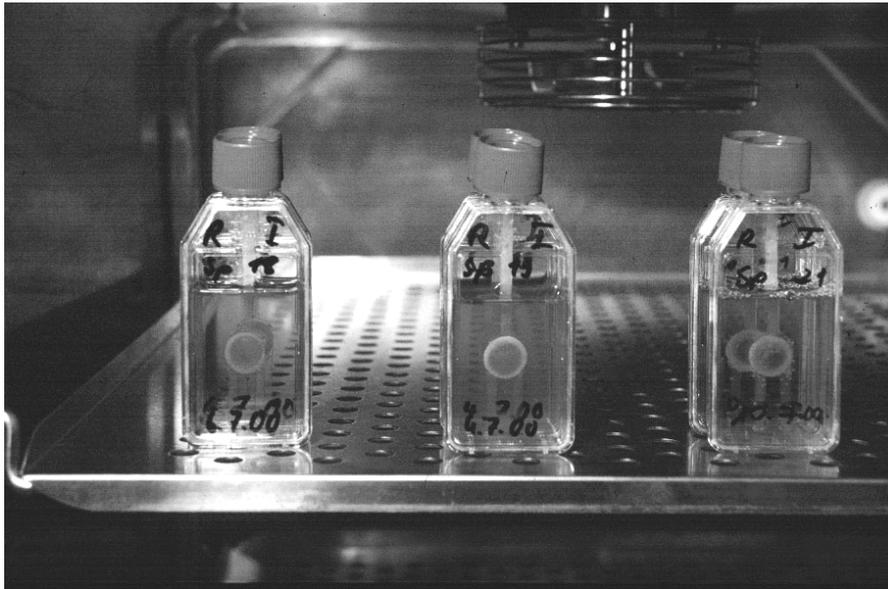


Abb. 4: Corneoskleralscheiben im Organkulturschrank bei 34,4°C

3.3. Messung der Endothelzellzahl

Bei den ersten 10 Hornhautpaaren wurde eine zusätzliche Messung der Endothelzellen vor der Aufbewahrung im Kühlschrank durchgeführt, um eine Schädigung der Hornhäute, aufgrund der Lagerung in einem Medium das eigentlich zur Organkultur verwendet wird, auszuschließen. Da im Kulturverlauf bei den jeweiligen Hornhautpaaren kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Entwicklung der Endothelzellzahl ersichtlich war, wurde aufgrund des osmotischen Stresses für die Zellen zukünftig auf die zusätzliche Zählung verzichtet.

Die erste Zählung erfolgte nach 7 Tagen Kulturdauer, da nach dieser Zeit ein

Mediumwechsel durchgeführt wird, um den Corneoskleralscheiben mit dem neuen Medium auch wieder neue Nährstoffe zuzuführen. Die zweite Zählung erfolgte dann unmittelbar vor der Transplantation, nachdem die Hornhäute am Tag zuvor in das Medium II der Firma Biochrom



Abb. 5: Mikroskop Leica DM IL

umgesetzt wurden, um eine Entquellung der Corneoskleralscheiben zu erreichen. Medium II besitzt im Gegensatz zum Medium I einen Zusatz von 60g Dextran 500 pro 1000 ml Medium I, was zu der für die Transplantation notwendigen Entquellung führt. Um die Zählung der Hornhaut unter dem

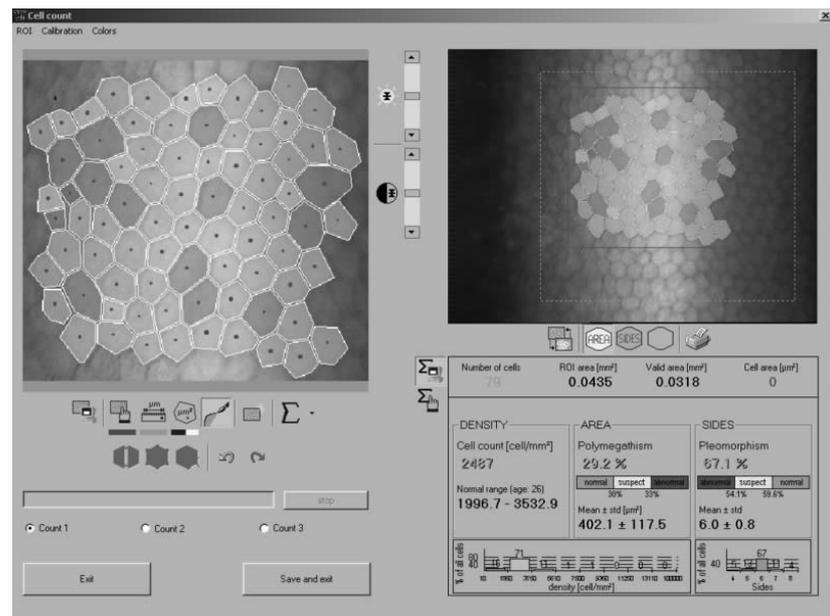


Abb. 6: Nidek-Software für den Endothelzellcount

Mikroskop durchführen zu können, wird die Corneoskleralscheibe unter der Sterilbank in eine geschlossene Gewebekulturschale eingebracht. Da eine Zählung der Endothelzellen aufgrund der Quellung und der kaum sichtbaren Zellgrenzen nur schwer möglich ist, wird die Hornhaut in der Gewebekulturschale in hypotone BSS-Lösung gegeben. Die osmotischen Kräfte führen zu einer Quellung der Zellgrenzen und bewirken hierdurch eine Zählbarkeit der Endothelzellzahl. Da dieser osmotische Stress für die Transplantate sehr belastend ist, sollte die Zählung so schnell wie möglich durchgeführt werden und nicht länger als 5 Minuten dauern. Von der Endothelzellschicht werden dann unter dem Mikroskop mehrere Aufnahmen gemacht, die Morphologie der Zellen begutachtet und der Anteil von Nekrosearealen beurteilt (siehe Abb. 7). Die Zählung erfolgt mittels eines Zählrasters, welches auf ein ausgedrucktes Bild aufgelegt wird. Die Vergrößerungseffekte durch Objektiv und Kamera müssen dabei berücksichtigt werden. Mit der so ermittelten Zellzahl kann dann die Endothelzellzahl pro Quadratmillimeter berechnet werden. Bei 30 Hornhäuten wurden die Aufnahmen mit dem neuen Bildanalyzesystem der Firma Nidek (siehe Abb. 6) durchgeführt, wobei sich kein relevanter Unterschied in der Zellzahl zeigte.

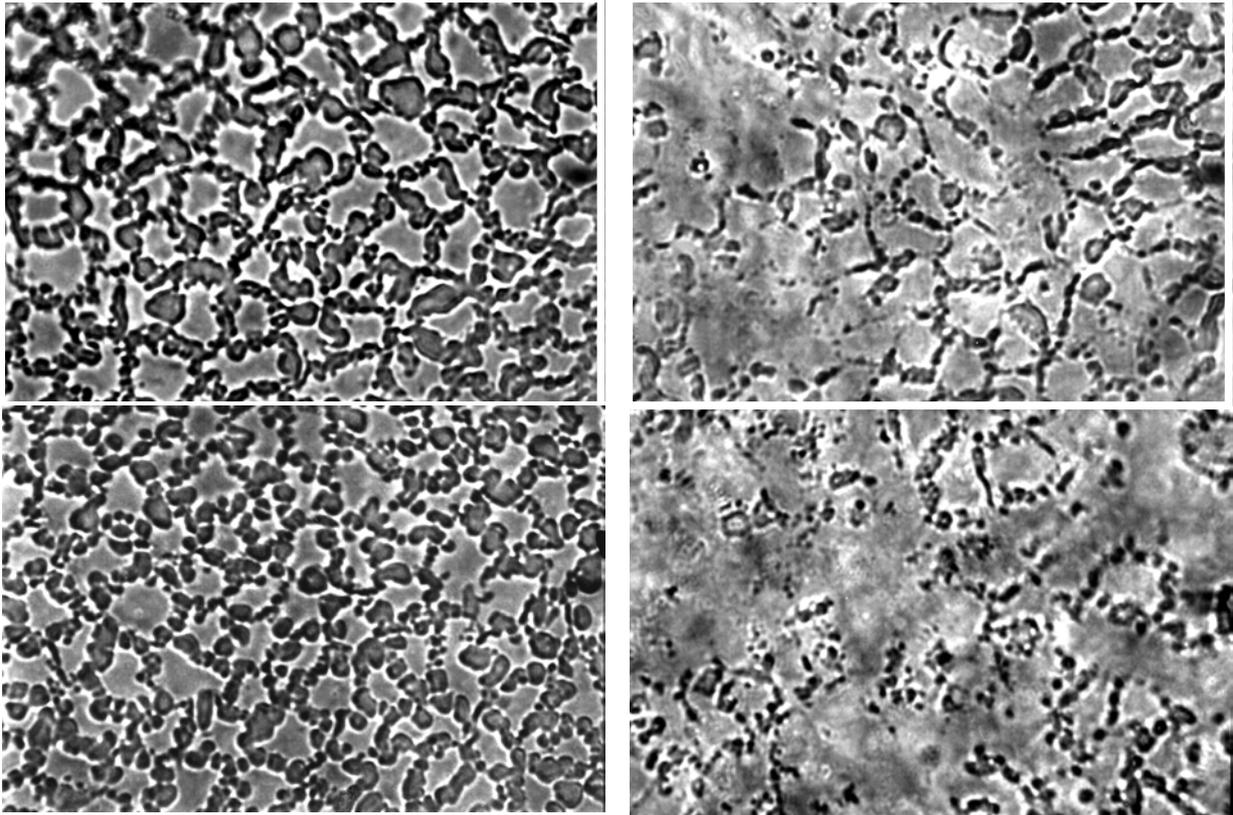


Abb. 7: Beispiele für Endothelzellaufnahmen, linke Seite intaktes Endothel, rechte Seite deutliche Nekroseareale

3.4. Zielgrößen

1. Endothelzellzahl in Abhängigkeit von der Art des Transportmediums
2. Endothelzellverlust pro Tag in Abhängigkeit von der Art des Transportmediums
3. Endothelzellverlust in Abhängigkeit von der Kulturdauer für beide Transportmedien

3.5. Datenerfassung und Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte prospektiv mittels eines standardisierten Fragebogens. Die Daten wurden aus den standardisierten Fragebögen in eine Excel-Datenbank eingegeben. Das Programm „Primer for Biostatistics“ wurde genutzt, um innerhalb der beiden Versuchsgruppen zunächst eine Varianzanalyse durchzuführen. Mit Hilfe von T-Tests wurden Parameter wie Kulturdauer, Endothelzellzahlen und

Endothelzellverlust verglichen. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Entnahme und Kultivierung der Corneoskleralscheibe

Es wurden im Zeitraum von September 2002 bis Oktober 2003 von 72 Spendern jeweils die Corneoskleralscheiben beider Augen entnommen. 38 der Spender waren männlich und 34 weiblich. Der jüngste Spender war 19 Jahre und der älteste Spender 79 Jahre alt, der Mittelwert betrug 63,0 Jahre.

Von den 144 Hornhäuten konnten 61 transplantiert werden, 30 davon wurden bis zur Organkultur in OptisolTM-GS und 31 in Medium I aufbewahrt. 57 Hornhäute wurden aufgrund eines Endothelschadens verworfen. Von diesen waren 26 in Medium I transportiert worden, 31 in OptisolTM-GS. Bei 14 Hornhäuten kam es zu einer Eintrübung des Mediums. Hier waren 9 Hornhäute in Medium I und 5 in OptisolTM-GS gelagert worden. Bei 6 Spendern war die Serologie für Hepatitis oder HIV positiv, wodurch weitere 12 potentielle Transplantate verworfen werden mussten. Bei 23 Spendern war es möglich, beide Hornhäute zu transplantieren. Daher waren auch nur die Transplantate dieser 23 Spender diejenigen, von denen sämtliche Werte erhoben werden konnten, die für die Auswertung dieser Studie nötig waren.

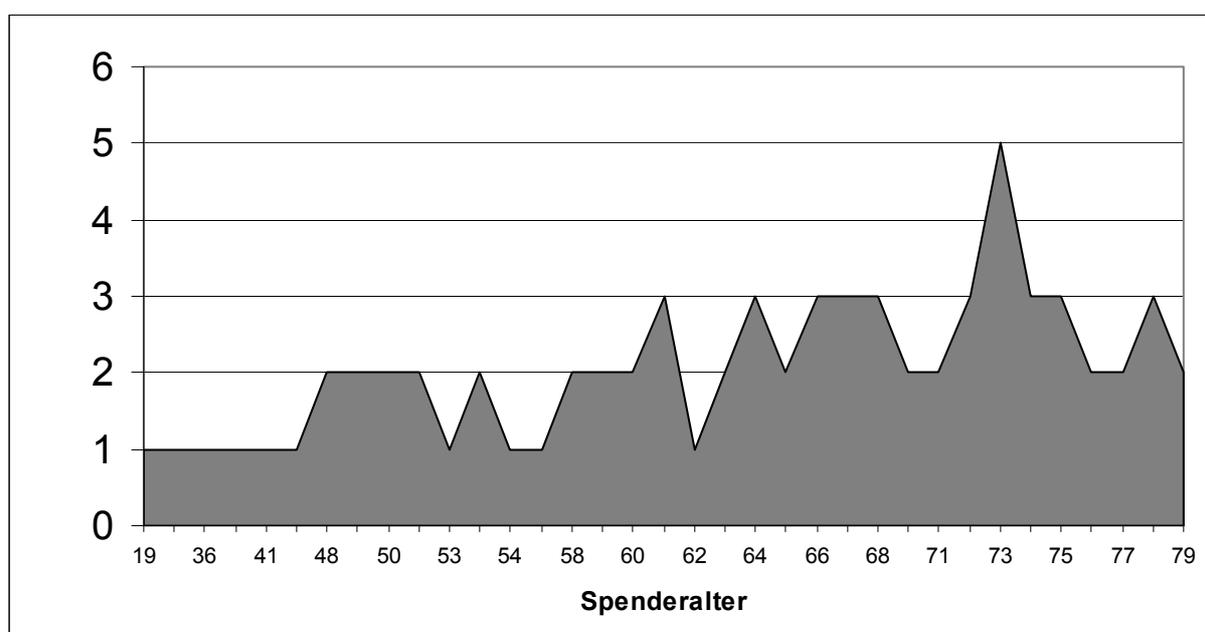


Abb. 8: Altersverteilung der Spender

Die Todesursachen reichten von Trauma bis Multiorganversagen. Die Spenderauswahl erfolgte anhand der Richtlinien deutscher Hornhautbanken und der darin enthaltenen Ausschlusskriterien zur Organspende. Die Zeit zwischen Kreislaufstillstand und Entnahmezeitpunkt lag zwischen 0,3 und 40,3 Stunden, durchschnittlich erfolgte die Entnahme nach 10,1 Stunden.

4.2. Transport und Lagerung

Für Optisol™-GS lag die Kulturdauer bei mindestens 13,5 und höchstens 27,4 Tagen. Im Mittel waren es 20,2 Tage. Bei den im Medium I transportierten Hornhäuten betrug die Kulturdauer zwischen 13,5 und 26,4 Tagen, der Mittelwert lag mit 20,0 Tagen etwas niedriger als bei den in Optisol™-GS aufbewahrten Hornhäuten. Jedoch ergab sich in der Kulturdauer kein signifikanter Unterschied ($P = 0,76$).

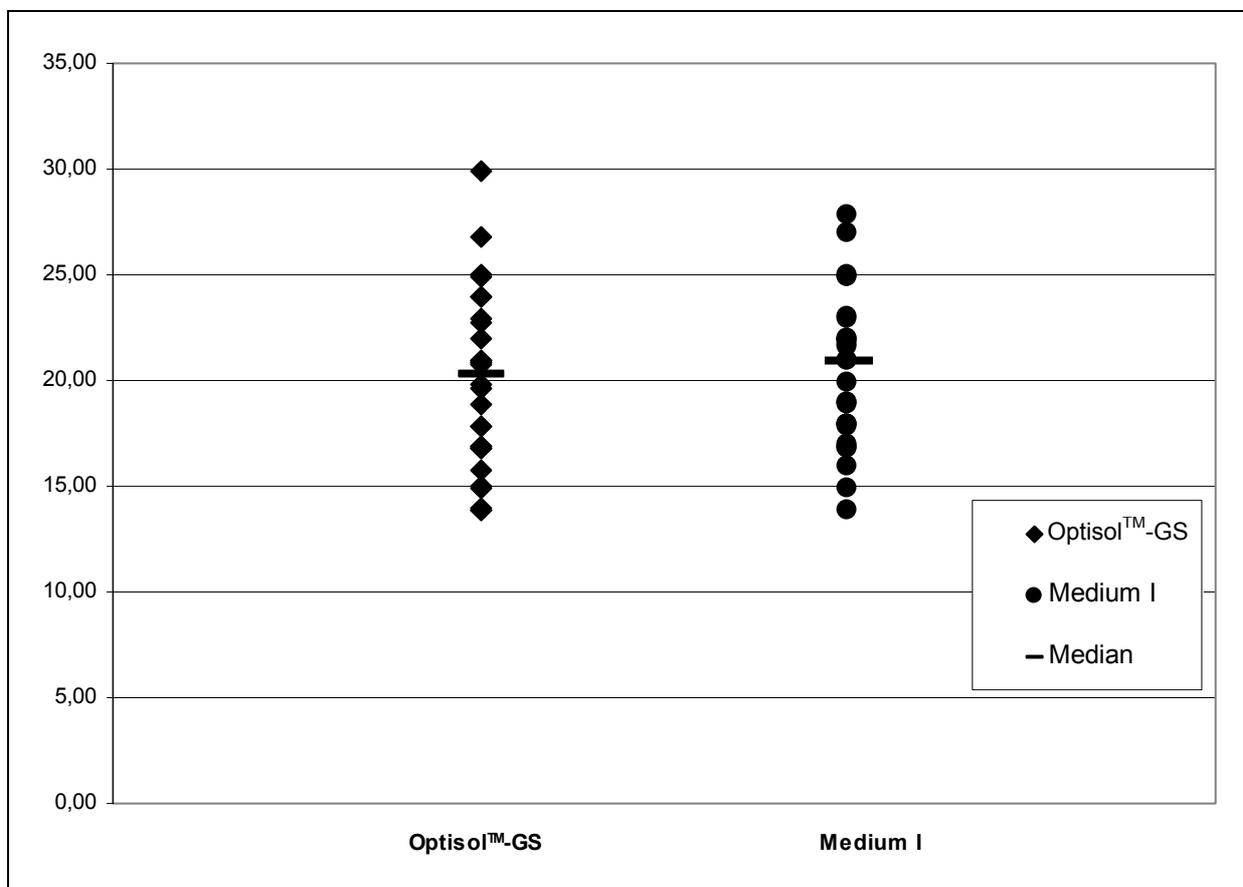


Abb. 9: Kulturdauer aufgeteilt nach Transportmedien

Die Transportdauer war bei den jeweiligen Paaren gleich und lag zwischen 0,5 und 62,5 Stunden im Mittel waren es 12 Stunden und 28 Minuten (SD 15h 50min).

4.3. Messung der Endothelzellzahl

Nach 7 Tagen in Kultur fand die erste Endothelzell-Zählung statt. Zu diesem Zeitpunkt schieden bereits 21 in Optisol™-GS und 23 in Medium I transportierte Hornhäute aus. Die zuvor beschriebene Medientrübung war bei 5 in Optisol™-GS und 9 in Medium I transportierten Corneoskleralscheiben der Grund. Bei 6 Spendern lag eine positive Hepatitis/HIV-Serologie vor, wodurch je Transportmedium 6 weitere Transplantate verworfen wurden. Nur bei wenigen Transplantaten (n=9, Optisol™-GS n=6, Medium I n=3) war der Endothelschaden bei dieser Zählung zu groß, um diese durchführen zu können. Insgesamt bestanden 18 (Optisol™-GS n=10, Medium I n=8) Hornhäute diese Zählung nicht, wurden also an diesem Punkt verworfen.

Bei den 55 vor Organkultur in Optisol™-GS gelagerten Hornhäuten, die bei dieser Zählung auswertbar waren, lag der Mittelwert dieser Messung bei 2379 ± 249 Zellen/mm². Von den in Medium I transportierten Transplantaten konnten hier 54 ausgewertet werden. Ihr Mittelwert lag bei 2371 ± 243 Zellen/mm².

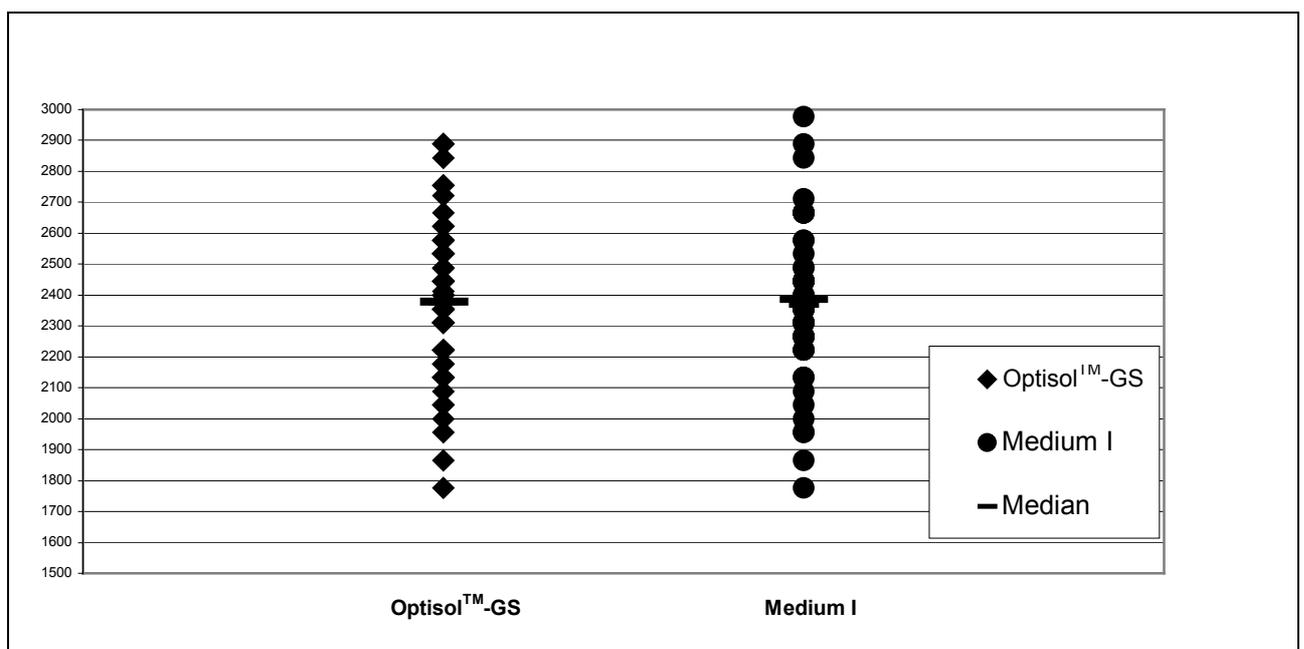


Abb. 10: Ergebnisse der Zählung nach 7 Tagen Organkultur aufgeteilt nach Transportmedien

Die zweite Zählung wurde am Tag der Transplantation durchgeführt.

Hier bestanden weitere 39 Hornhäute die Anforderungen nicht. Von diesen erzielten die in Optisol™-GS gelagerten einen Mittelwert von 1538 Zellen/mm², die in Medium I gelagerten 1628 Zellen/mm². Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($P = 0,61$).

Von den 61 transplantierten Hornhäuten wurden 30 in Optisol™-GS und 31 in Medium I transportiert. Die Zählung der bis zur Organkultur in Optisol™-GS gelagerten Transplantate ergab 2263 ± 146 Zellen/mm², für Medium I 2225 ± 183 Zellen/mm² ($P = 0,373$).

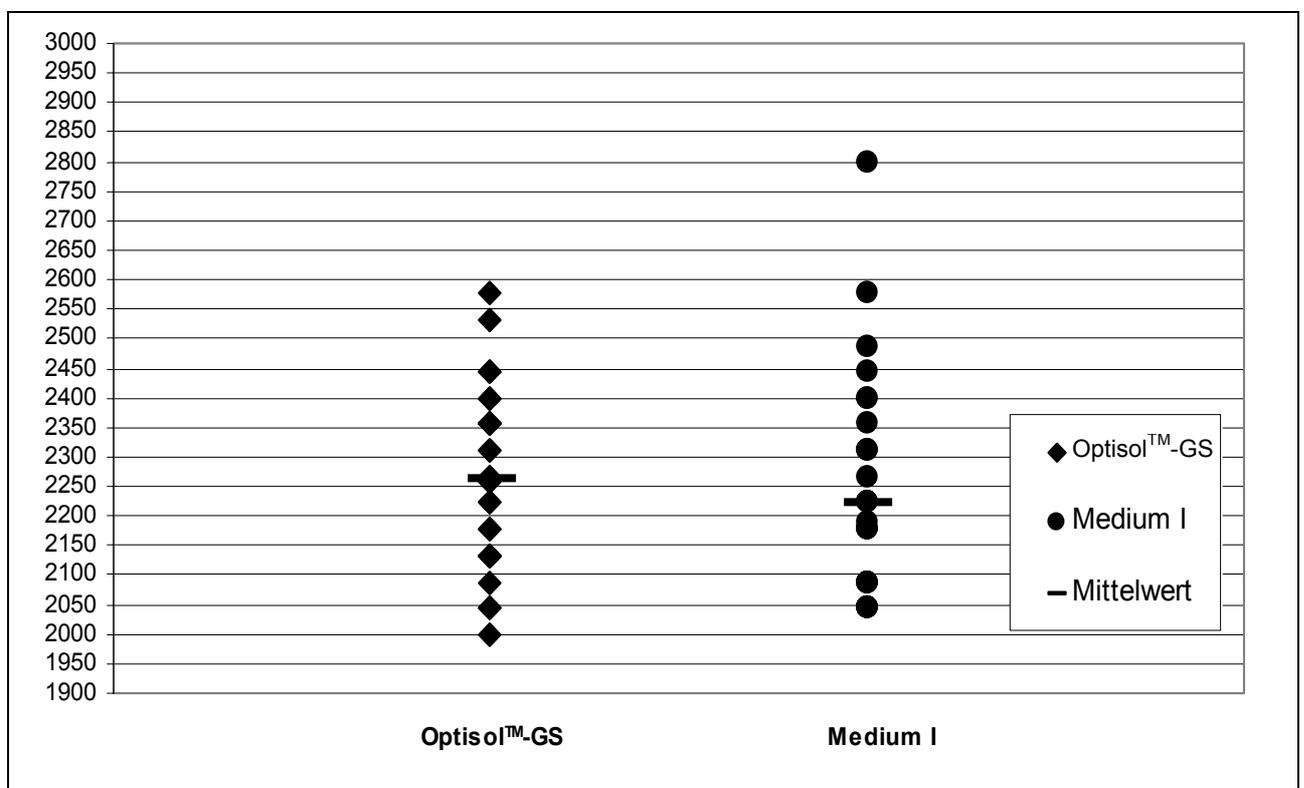


Abb. 11: Ergebnisse der Zählung am Tag der Transplantation aufgeteilt nach Transportmedien

Unter der Annahme eines konstanten Endothelzellverlustes pro Tag betrug dieser bei den vor Kultur in Optisol™-GS transportierten Corneoskleralscheiben zwischen -7,47 bis 26,43 Zellen pro Tag. Bei den in Medium I transportierten lag er zwischen -7,91 und 36,24 Zellen pro Tag ($P = 0,75$). Die negativen Werte, also ein Gewinn an Zellen im Laufe der Organkultur, sind am ehesten auf eine bessere Zählbarkeit der Endothelzellschicht am Tag der Transplantation zurückzuführen, da die Hornhäute

mindestens 12 Stunden vorher in Medium II umgesetzt wurden. Medium II führt durch den Zusatz von Dextran zu einer Entquellung der Corneoskleralscheiben und damit auch zu einer Verringerung der Fältelung im Bereich der Descemetischen Membran. Unter dem Mikroskop ist durch die Entquellung und geringere Fältelung die Endothelzellschicht einfacher darstell- und auswertbar.

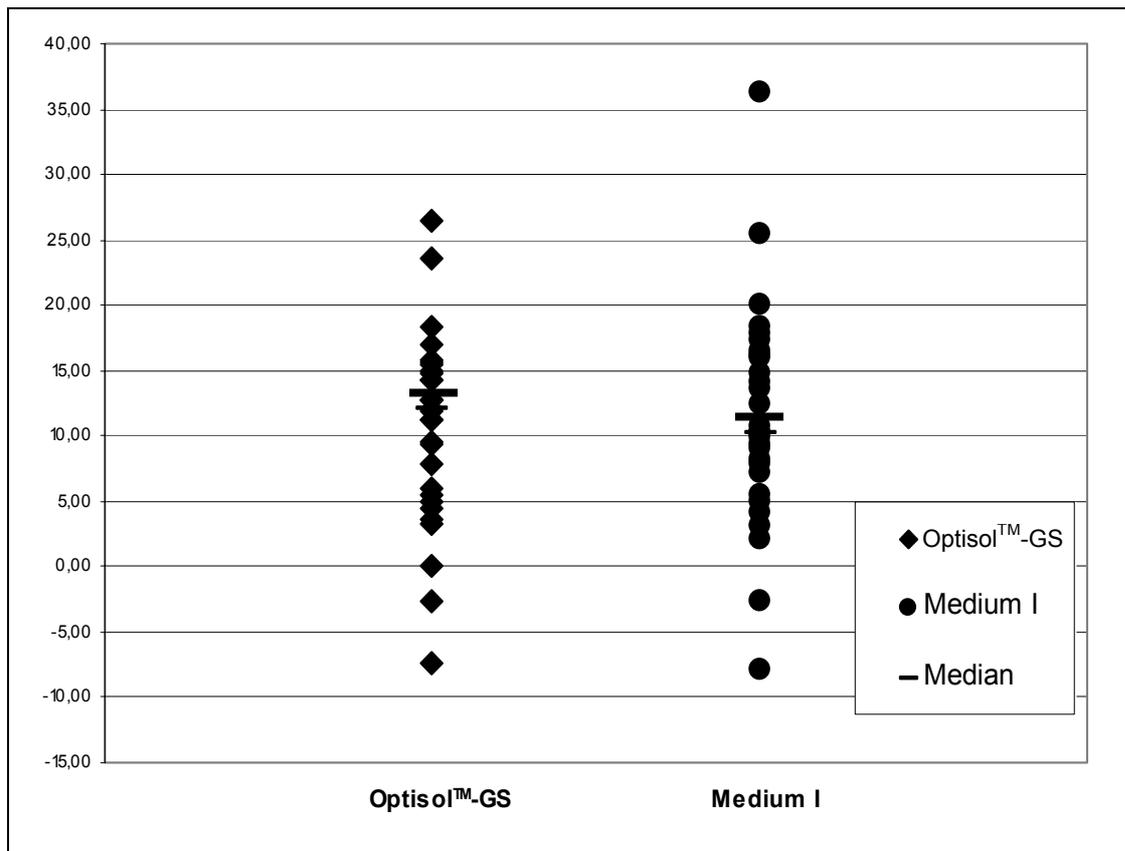


Abb. 12: Endothelzellverlust pro Tag zwischen den beiden Zählungen am Tag 7 der Organkultur und am Tag der Transplantation aufgeteilt nach Transportmedien

5. DISKUSSION

In der vorgelegten Studie wurden zwei verschiedene Hornhauttransportmedien auf ihren Einfluss auf die spätere Organkultur verglichen. Es wurde entweder die rechte oder die linke Corneoskleralscheibe eines Spenders in OptisolTM-GS und die der Gegenseite in Medium I der Firma Biochrom eingebracht. Die Corneoskleralscheiben wurden dann in den jeweiligen Transportmedien in die Hornhautbank transportiert und dort bis zur Entnahme im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Da die Hornhautbank nicht rund um die Uhr besetzt ist, differiert die Transportdauer je nach Entnahme-Uhrzeit und Wochentag zwischen 0,5h und 62,5h, für einen Spender beziehungsweise Spenderscheibenpärchen ist sie jedoch gleich. Die Corneoskleralscheiben wurden nach dem Transport und der Aufbewahrung im Kühlschrank in die Organkulturlösung Medium I der Firma Biochrom mit dem Zusatz von fetalem Kälberserum eingebracht. Das Umsetzen in die Organkulturlösung und alle weiteren Arbeitsgänge wurden unter einer sterilen Werkbank, einer so genannten „Laminar flow“ Einheit durchgeführt.

Unter der Annahme, dass die beiden Transportmedien sich unterschiedlich auf die Entwicklung der Endothelzellzahl auswirken, wurde die Entwicklung dieser im Verlauf der Organkultur ausgewertet.

Aus der ersten Kurzzeitkonservierung für Hornhäute von Filatov¹³, bei der ein kompletter Bulbus in einer feuchten Kammer gelagert und so zumindest eine kurze Zeit ohne großen Endothelzellschaden aufbewahrt werden konnte, entwickelten sich in den siebziger und achtziger Jahren die beiden heute am weitesten verbreiteten Kulturmethoden: 1. Cold-Storage bei 4°C und 2. Organkultur bei 30°-37°C. Pels et al.³⁰ geben in Ihrer Arbeit einen schönen Überblick über die verschiedenen Kulturmethoden und die benutzten Kulturmedien. Einen eindeutigen Vorteil einer der beiden Methoden konnten Sie nicht feststellen, jedoch gibt es einige Gründe, die für die Organkultur sprechen. In der Organkultur konnte Doughman¹¹ Reparaturmechanismen des Endothels während der Organkultur nachweisen. Außerdem kommt es im Laufe der Organkultur zu einer Reduktion von so genannten „Passenger“-Leukozyten (=Langerhanszellen), und das Epithel des Spendergewebes geht größtenteils verloren. Dies sind beides Faktoren, die die Immuneigenschaften des Transplantates im Bezug auf eine Abstoßungsreaktion positiv beeinflussen könnten.

Wie Pels et al.³⁰ in Ihrer Arbeit feststellten, gibt es durchaus unterschiedliche Ansichten, welche die am besten geeignete Kulturmethode ist. In Amerika ist die Cold-Storage-Methode vorherrschend, während in Europa überwiegend die Organkultur bevorzugt wird. Aufgrund der unterschiedlich durchgeführten Entnahmemethoden (Entnahme des kompletten Bulbus versus Entnahme einer Corneoskleralscheibe) gibt es auch Kombinationen der Kulturmethoden. Bei der Bulbusentnahme wird in der Regel die Corneoskleralscheibe nach der Trepanation des Bulbus in der Hornhautbank gleich in Kultur genommen. Wird jedoch direkt am Spender eine Trepanation der Corneoskleralscheibe durchgeführt, so wird die Hornhaut bis zur Organkultur bei Cold-Storage-Bedingungen aufbewahrt.

In der hier präsentierten Studie wird nun auf diese Besonderheit eingegangen. Der Zeitraum, in dem sich die Kultivierungsmethode unterscheidet, ist dadurch viel kürzer als in den genannten Studien. In beiden Transportmedien wurden die Transplantate bei 4°C gelagert. Medium I ist für diese Temperatur zwar nicht ausgelegt. Wie hier demonstriert, ergeben sich trotzdem keine nachteiligen Effekte für die Corneoskleralscheiben und auch bei dieser Anwendung sehr gute Ergebnisse.

Eine Studie, die der hier präsentierten verhältnismäßig nahe kommt, wurde von Frueh et al.¹⁵ 2000 durchgeführt. Hier wurden Cold-Storage in Optisol™-GS und Organkultur vor Transplantation gegeneinander getestet. Wie in unserer Arbeit ergaben sich in Zellzahl keine signifikanten Unterschiede, auch wenn dort die zweite Zellzählung am Patienten und nicht wie hier im Labor durchgeführt wurde. Auch in der Hornhautdicke ergaben sich bei Frueh et al. keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kulturmethoden.

Stoiber³⁷ et al., die Eurosol™ und Organkultur miteinander verglichen, konnten auch keinen Unterschied, was die Hornhautdicke oder Endothelzellzahl anging, feststellen. Hagenah¹⁶ et. al verglichen in Ihrer Arbeit die Organkultur mit Hornhäuten, die nur kurzfristig in der feuchten Kammer aufbewahrt wurden. Auch bei diesem Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Hornhautqualität festgestellt werden.

6. Praktische Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die Verwendung eines relativ teuren Cold-Storage Mediums, wie Optisol™-GS, für den Transport nicht unbedingt notwendig ist. Ein ähnlicher Vergleich reiner Transportmedien wurde bisher nicht durchgeführt.

Unsere Hornhautbank wurde nicht nur mit Unterstützung von LIONS-International am 14.07.2000 gegründet, sondern wird weiterhin ständig vom LIONS-Hilfswerk im Sinne einer Dauer-Activity unterstützt. Trotz dieser großzügigen Hilfe ist, aufgrund einer ungenügenden finanziellen Abbildung von Hornhautentnahme und Kultivierung in unserem Gesundheitssystem eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von großem Interesse für Hornhautbanken, deren Abläufe bezüglich Entnahme und Kultivierung den unseren gleichen. Optisol™-GS kostet pro Aufbewahrungseinheit 41,41€, Medium I hingegen 3,17€.

In der Entwicklung neuer Kulturmedien stehen vor allem zwei Aspekte im Vordergrund, erstens der Verzicht auf das derzeit noch notwendige fetale Kälberserum und zweitens Minimierung der Schwellung während der Organkultur. Derzeit werden in den meisten Hornhautbanken noch Restbestände von fetalem Kälberserum aus Südamerika verwendet, welches vor dem Auftreten von BSE-Erkrankungen gewonnen wurde. Derzeit sind in der Kategorie I (höchst unwahrscheinlich) des „Geographical BSE Risk Assessment“ (http://www.bvet.admin.ch/tiergesundheit/00199/index.html?lang=de&download=00499_de.pdf) noch 10 Länder eingestuft. Hierzu gehören unter anderem Australien, Argentinien, Neuseeland und Island.

Die Arbeitsgruppen von Reim³³, Bednarz³ und Hempel¹⁸ hatten bereits 2001 erste Erfolge in der Entwicklung eines serumfreien Mediums. Camposampiero⁹ et al. zeigten 2003, dass ein Ersatz von fetalem Kälberserum eventuell durch Hühner-Ovalbumin möglich ist. Rieck³⁴ et al. hingegen setzten einem serumfreien Medium FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) zu und erzielten damit auch sehr gute Resultate.

Dennoch ist derzeit kein kommerzielles serumfreies Medium verfügbar.

Redbrake³¹ et al. zeigten, dass unter Zusatz von HES 130 das Aufquellen der Hornhäute während der Organkultur vermindert werden kann. Dadurch wird das derzeit notwendige Umsetzen vor Transplantation unnötig und der osmotische

Stress, der auf die Zellen der Hornhaut während der Organkultur einwirkt, deutlich reduziert.

Ein weiterer Punkt, der in Zukunft berücksichtigt werden muss, sind die refraktiv-chirurgischen Eingriffe, die im Laufe der letzten Jahre deutlich zugenommen haben². Durch die refraktiv-chirurgischen Eingriffe wird die Hornhaut deutlich dünner, dies führt zu Problemen beim Einnähen des Transplantates und beeinflusst die postoperative Refraktion in erheblichem Ausmaß. Bei der Entnahme sind durchgeführte refraktiv-chirurgische Operationen mit der Spaltlampe kaum sichtbar und auch während Organkultur und den dabei durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen kaum zu erkennen. Die Kultivierungsmethode spielt hierbei jedoch keine Rolle.

Zusammenfassend führt die Verwendung von Medium I zum Transport zu einer Kostenersparnis von ca. 38 € pro Transplantat, das in die Hornhautbank gebracht wird. Bei ca. 200 Transplantaten pro Jahr können so in einer Hornhautbank mittlerer Größe ca. 8.000 € eingespart werden. Im Verbund der Arbeitsgemeinschaft deutscher Hornhautbanken, werden damit im Ganzen beträchtliche Summen frei, um neue Lösungen für die Zukunft zu finden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ardjomand N., Komericki P., Radner H., Aigner R., Reich M.E. (1997) Korneale Langerhans-Zellen: Verhalten während der Lagerung in Organkultur. *Ophthalmologe* 94, 703-706.
2. Basu P.K. (1995) A review of methods for storage of corneas for keratoplasty. *Indian J. Ophthalmol.* 43, 55-58.
3. Bednarz J., Doubilei V., Wollnik P.C., Engelmann K. (2001) Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1416-1420.
4. Bigar F., Kaufman H.E., McCarey B.E., Binder P.S. (1975) Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in man. *Am. J. Ophthalmol.* 79, 115-120.
5. Böhnke M., Draeger J. (1983) Klinische Ergebnisse nach perforierender Keratoplastik unter Verwendung verschiedenartig konservierter Hornhäute. *Fortschr. Ophthalmol.* 80, 422-425.
6. Böhnke M., Draeger J., Winter R. (1984) Möglichkeiten und biologische Eigenschaften verschiedenartig angelegter Methoden zur Hornhautkonservierung. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 185, 91-94.
7. Brunette I., Le Francois M., Tremblay M.C., Guertin M.C. (2001) Corneal transplant tolerance of cryopreservation. *Cornea* 20, 590-596.
8. Burki E. (1956) [Keratoplasty with paraffin material; preservation of cornea.]. *Bibl. Ophthalmol.* 5, 1-114.
9. Camposampiero D., Tiso R., Zanetti E., Ruzza A., Bruni A., Ponzin D. (2003) Cornea preservation in culture with bovine serum or chicken ovalbumin. *Cornea* 22, 254-258.
10. Doughman D.J. (1980) Prolonged donor cornea preservation in organ culture: long-term clinical evaluation. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 78, 567-628.

11. Doughman D.J., Van Horn D., Rodman W.P., Byrnes P., Lindstrom R.L. (1976) Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch. Ophthalmol.* 94, 1791-1796.
12. Eagle H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
13. Filatov VP. (1935) Transplantation of the cornea. *Arch. Ophthalmol.* 321-347.
14. Frenzel J., Sieben R., Porsche P., Landefeld H., Vonderhecken S., Reim M. (1988) Vergleich der Lagerung von Humancorneae in verschiedenen Kulturmedien bei Raumtemperatur und 31°C. *Fortschr. Ophthalmol.* 85, 190-195.
15. Frueh B.E., Böhnke M. (2000) Prospective, randomized clinical evaluation of Optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch. Ophthalmol.* 118, 757-760.
16. Hagenah M., Carstens D., Böhnke M., Winter R. (1997) Entwicklung der Endothelzellichte bei Verwendung von frischem und organkultiviertem Gewebe 5 Jahre nach perforierender Keratoplastik. *Ophthalmologe* 94, 90-93.
17. Halberstadt M., Böhnke M., Athmann S., Hagenah M. (2003) Cryopreservation of human donor corneas with dextran. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5110-5115.
18. Hempel B., Bednarz J., Engelmann K. (2001) Use of a serum-free medium for long-term storage of human corneas. Influence on endothelial cell density and corneal metabolism. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239, 801-805.
19. Holland E.J., DeRuyter D.N., Doughman D.J. (1987) Langerhans cells in organ-cultured corneas. *Arch. Ophthalmol.* 105, 542-545.
20. Katzin H.M. (1947) The preservation of corneal tissue by freezing and dehydration. *Am J. Ophthalmol.* 30, 1128-1134.
21. Kaufman H.E., Beuerman R.W., Steinemann T.L., Thompson H.W., Varnell E.D. (1991) Optisol corneal storage medium. *Arch. Ophthalmol.* 109, 864-868.

22. Kaufman H.E., Varnell E.D., Kaufman S., Beuerman R.W., Barron B.A. (1985) K-Sol corneal preservation. *Am J. Ophthalmol.* 100, 299-304.
23. Lindstrom R.L., Doughman D.J., Van Horn D.L., Dancil D., Harris J.E. (1976) A metabolic and electron microscopic study of human organ-cultured cornea. *Am. J. Ophthalmol.* 82, 72-82.
24. Magitot A. (1911) Recherches expérimentales sur la survie de la cornée conservée en dehors l'organisme et sur la kératoplastie différée. *Ann. Ocul. Paris.* 146, 1-34.
25. Mathieu M., Pager R., Bernier R.G., Lefrancois M. (1985) Results obtained in perforating keratoplasty with corneas preserved in liquid nitrogen. *Dev. Ophthalmol.* 11, 49-54.
26. McCarey B.E., Meyer R.F., Kaufman H.E. (1976) Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in humans. *Ann. Ophthalmol.* 8, 1488-92, 1495.
27. Morgan J.F., Morton H.J., Parker R.C. (1950) Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 1-8.
28. Niederkorn J.Y. (2002) Immunology and immunomodulation of corneal transplantation. *Int. Rev. Immunol.* 21, 173-196.
29. Pels E., Schuchard Y. (1983) Organ-culture preservation of human corneas. *Doc. Ophthalmol.* 56, 147-153.
30. Pels L. (1997) Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *Br. J. Ophthalmol.* 81, 523-525.
31. Redbrake C., Kompa S., Altmann G., Reim M., Arend O. (2006) HES 130 als Dauerzusatz in der Organkultur humaner Hornhäute? *Ophthalmologe* 103, 43-47.
32. Reim M., Lax F., Lichte H., Turss R. (1967) Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aqueous humor, blood and tears in vivo. *Acta Ophthalmol.* 154, 39-50.

33. Reim M., Pantenburg F.J., Ziegler C.D. (2001) Einfluss von Serum und osmotisch wirksamen Substanzen auf den Stoffwechsel in 262 Organkulturen der Kornea von Schweineaugen: Ein Beitrag zur Verbesserung des Spendermaterials zur Keratoplastik. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 218, 95-101.
34. Rieck P.W., Gigon M., Jaroszewski J., Pleyer U., Hartmann C. (2003) Increased endothelial survival of organ-cultured corneas stored in FGF-2-supplemented serum-free medium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3826-3832.
35. Seitz B. (1999) Möglichkeiten und Grenzen der Hornhaut-Transplantation heute. Manuskript der Antrittsvorlesung am 22. 02.1999 an der Universitätsaugenklinik Erlangen
<http://www.onjoph.com/deutsch/artikel/hhtrans.html>
36. Sperling S. (1979) Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 57, 269-276.
37. Stoiber J., Ruckhofer J., Lametschwandtner A., Muss W., Hitzl W., Weikinger K., Grabner G. (2001) Eurosol versus fetal bovine serum-containing corneal storage medium. *Cornea* 20, 205-209.
38. Summerlin W.T., Miller G.E., Harris J.E., Good R.A. (1973) The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Invest Ophthalmol.* 12, 176-180.
39. Sundmacher R., Reinhard T. (2001) Bedarfsdeckung mit qualitätsgesicherten Hornhautimplantaten Rolle der Hornhautbanken und der Kostenträger in Deutschland . *Der Ophthalmologe* 98, 277-284.
40. Urrets-Zavalía A., Jr. (1964) Spontaneous desiccation of corneal donor material. *Am J. Ophthalmol.* 57, 247-255.
41. Wernet P., Kogler G., Enczmann J., Kuhrober A., Knipper A.J., Bonte W., Reinhard T., Sundmacher R. (1998) Rapid method for successful HLA class I and II typing from cadaveric blood for direct matching in cornea transplantation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236, 507-512.

42. Zirm E.K. (1906) Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). *Refract. Corneal Surg.* 5, 258-261.

8. DANK

Für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Berthold Seitz, Direktor der Universitäts-Augenklinik Homburg (Saar). Er hat mich bei der Ausarbeitung unterstützt, immer wieder motiviert und auch bei der Korrektur hilfreiche Ratschläge gegeben.

Für die Überlassung des Themas sowie der freundlichen Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit, bedanke ich mich bei dem ehemaligen Direktor der Universitäts-Augenklinik, Herrn Prof. Dr. med. Klaus W. Ruprecht. Im Besonderen möchte ich mich für seine Geduld, die er im Bezug auf diese Arbeit mit mir gehabt hat, bedanken.

Herrn Dr. med. Andreas Schröder, danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und seinen unermüdlichen Antrieb, wodurch er sicher maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Oberarzt Dr. med. Stephan Spang, bedanke ich mich besonders für seine wertvollen Ratschläge bei der Konzipierung und Ausarbeitung des experimentellen Ansatzes.

Frau Sybille Warmann und Frau Margarethe Zawada, Medizinisch-Technische Assistentinnen, haben mich tatkräftig bei den Arbeiten im Hornhautbanklabor unterstützt und darauf geachtet, dass die Abläufe, von allen beteiligten Personen, den Richtlinien entsprechend eingehalten wurden.

Meiner Schwiegermutter, Frau Dr. med. dent. Gunda Fechner, danke ich für unermüdliches Korrekturlesen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben, auch wenn mein Weg nicht immer der Zielstrebigste war. Sie ermöglichten mir das Studium der Medizin welches der Grundstein für diese Promotion war.

Meiner Frau Katharina und meinem Sohn Oscar-Maximilian danke ich für die Geduld, die Sie mit mir hatten und das Verständnis für zahlreiche Abende die ich am PC verbrachte.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Attila Osvald
Geburtsdatum: 27. August 1969
Geburtsort: Bratislava
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet

Eltern: Dr. med. Attila Osvald, Frauenarzt verstorben 1997
Hella Osvald, geb. Edler, Augenärztin

Geschwister: Claudia Osvald, verstorben 1981

Ehefrau: Katharina Osvald, geb. Fechner, Hebamme

Sohn: Oscar-Maximilian geb. 2005

Schulbildung

09.1976 - 02.1978 Grund- und Hauptschule (Grundschule), Bad Wimpfen
03.1978 - 08.1980 Hoerschbachschule (Grundschule), Murrhardt
09.1980 - 08.1985 Heinrich von Zügel Gymnasium, Murrhardt
09.1985 - 06.1989 Schloss-Schule Kirchberg, Kirchberg/Jagst
Abschluß: Abitur

Grundwehrdienst

06.1989 - 08.1990 Panzerbatallion 3./361, Kulsheim

Hochschulausbildung

10.1990 - 09.1994 Vorklinisches Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
10.1994 - 09.1998 Klinisches Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
10.1998 - 10.1999 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum des Saarlandes
11.1999 Abschluß des Studiums

Ärztliche Anstellung

03.2000 – 08.2001 AiP
Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes,
Homburg (Saar), Direktor: Prof. Dr. med. K. W. Ruprecht

seit 09.2001 Assistenzarzt,
Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes,
Homburg (Saar), Direktor: Prof. Dr. med. K. W. Ruprecht

seit 07.2006 Facharzt für Augenheilkunde,
Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes,
Homburg (Saar), Direktor: Prof. Dr. med. B. Seitz

seit 07.2006 Funktionsoberarzt,
Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes,
Homburg (Saar), Direktor: Prof. Dr. med. B. Seitz