

Optimierung der Kalt-Lagerungskonservierung für Cornea-Transplantate  
am Schweineauge

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Miriam Schmalz



Aus dem  
Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Schweine  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**und dem**  
Institut für experimentelle Medizin  
der Universität zu Köln  
Betreuer: Prof. Dr. J. H. Fischer

**Optimierung der Kalt-Lagerungskonservierung für  
Cornea-Transplantate am Schweineauge**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Miriam Schmalz**  
Tierärztin aus Bergisch Gladbach

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Prof. Dr. J. H. Fischer

Tag der Disputation: 22.01.2009

# Erklärungen

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Köln, den 19.10.2008

(Miriam Schmalz)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Anatomie der Cornea . . . . .	1
1.2	Geschichte der Transplantation . . . . .	2
1.3	Geschichte der Konservierung . . . . .	5
1.3.1	Hypotherme Lagerung . . . . .	6
1.3.2	Organkulturlagerung . . . . .	7
1.4	Versuchsziele . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Gewinnung der Schweineaugen . . . . .	9
2.2	Aufbereitung der Cornea . . . . .	9
2.2.1	Bulbusdesinfektion . . . . .	9
2.2.2	Corneaexzision . . . . .	10
2.3	Gruppeneinteilung . . . . .	10
2.4	Lagerung der Cornea . . . . .	11
2.5	Endothelfärbung . . . . .	13
2.5.1	Evaluation der Zelldichte . . . . .	14
2.5.2	Flächenmessung der intakten Teilbereiche . . . . .	15
2.5.3	Ermittlung der Corneadicke . . . . .	16
2.6	Adeninnukleotidmessung . . . . .	16
2.6.1	Deproteinierung . . . . .	16
2.6.2	Probenaufbereitung für die HPLC . . . . .	17
2.6.3	High Performance Liquid Chromatography . . . . .	17
2.7	Trockengewichtbestimmung . . . . .	18
2.8	statistische Aufbereitung . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	Mikroskopische Untersuchungen . . . . .	21
3.1.1	intakte Teilbereiche der Gesamtcornea (in %) . . . . .	21

3.1.2	Anzahl der vollständig defekten Corneae . . . . .	22
3.1.3	intakte und defekte Zellzahlen . . . . .	23
3.1.4	Corneadickenmessung . . . . .	26
3.2	Adeninnukleotidmessung . . . . .	28
3.2.1	Summe der Adeninnukleotide . . . . .	28
3.2.2	Energy Charge Potential . . . . .	29
3.2.3	ATP-Gehalt . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1	Tiermodell . . . . .	33
4.2	Methode . . . . .	33
4.2.1	Transport und Aufbereitung . . . . .	33
4.2.2	Färbung . . . . .	34
4.2.3	HPLC . . . . .	35
4.3	Konservierungsmedien . . . . .	36
4.3.1	Antibiotika und Antimykotika . . . . .	37
4.3.2	FCS . . . . .	39
4.3.3	HES . . . . .	40
4.3.4	Chen-Medium . . . . .	41
4.3.5	Optisol-GS . . . . .	42
4.4	Ergebnisse . . . . .	43
4.4.1	Stoffwechselergebnisse . . . . .	43
4.4.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen . . . . .	44
4.4.3	Ergebnisse der Corneadickenmessungen . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>53</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
	<b>Danksagungen</b>	<b>63</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie des Auges . . . . .	1
1.2	Zellschichten der Cornea . . . . .	1
1.3	sklerale Haltefäden . . . . .	3
1.4	DLEK . . . . .	4
1.5	Descemtorhexis . . . . .	5
2.1	Schema der Zellzählung . . . . .	14
2.2	scharfes Abbild des Corneaendothels, Chen 14 Tage . . . . .	15
2.3	Flächenmessung, Chen 14 Tage . . . . .	15
3.1	intakte Teilbereiche, Chen 14 Tage . . . . .	21
3.2	intakte Teilbereiche, Optisol 14 Tage . . . . .	21
3.3	Diagramm intakter Teilbereiche . . . . .	22
3.4	Diagramm intakter Zellen . . . . .	23
3.5	Diagramm defekter Zellen . . . . .	23
3.6	Zellfotografie, Inkubator 7 Tage . . . . .	25
3.7	Zellfotografie, Inkubator 14 Tage . . . . .	25
3.8	Zellfotografie, Chen 7 Tage . . . . .	25
3.9	Zellfotografie, Chen 14 Tage . . . . .	25
3.10	Zellfotografie, Optisol 7 Tage . . . . .	25
3.11	Zellfotografie, Optisol 14 Tage . . . . .	25
3.12	Diagramm der Corneadicke . . . . .	26
3.13	Diagramm der Summe der Adeninnukleotide . . . . .	28
3.14	Diagramm des Energy Charge Potentials . . . . .	29
3.15	Diagramm des ATP-Gehalts . . . . .	30



# Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung . . . . .	9
2.2	Zusammensetzung der 0,2 mol PBS . . . . .	10
2.3	Gruppenaufteilung und Anzahl der Proben . . . . .	11
2.4	Bestandteile von Medium 199 (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) . . . . .	12
2.5	Zusammensetzung des Entquellmediums . . . . .	12
2.6	Zusammensetzung des Chen-Mediums . . . . .	13
2.7	Zusammensetzung der Organkulturlösung . . . . .	13
2.8	Herstellung der Färbelösungen . . . . .	14
3.1	mikroskopische Auswertung, MW $\pm$ SD; Zellauszählung nur in den intakten Teilbereichen . . . . .	27
3.2	Stoffwechselzustand, MW $\pm$ SD . . . . .	27

# Abkürzungsverzeichnis

ACF	animal compound-free
A. dest	Aqua destillata
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
CSM	Closed Minnesota System Medium
DLEK	deep lamellar endothelial keratoplasty
DM	Descemetorhexis
DSEK	Descemet's-stripping endothelial keratoplasty
ECP	energy charge potential
EGF	Epidermal Growth Factor
EK	endotheliale Keratoplastik
FCS	fetal calf serum
HES	Hydroxyethylstärke
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MEM	Minimum Essential Medium
MW	Mittelwert
PBS	phosphate buffered saline
PLK	posteriole lamelläre Keratoplastik
PVP-I	Polyvinylpyrrolidon-Iodine
SAN	Summe der Adeninnukleotide
SD	standard deviation
SFM	serumfree medium
TG	Trockengewicht

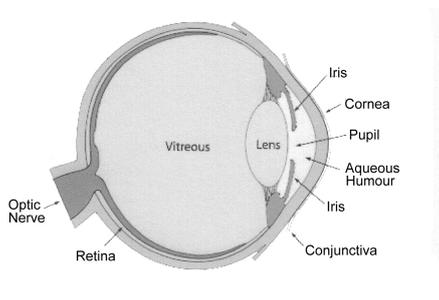
# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie der Cornea

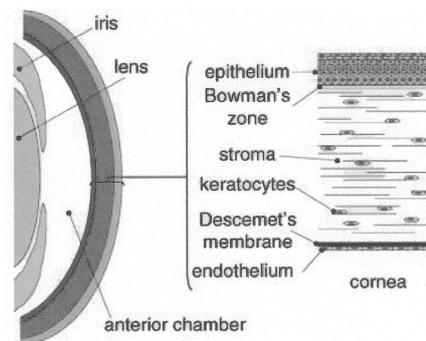
Die durchsichtige Cornea bildet zusammen mit der undurchsichtigen Sklera die fibröse Hülle des Auges. Eine anatomische Besonderheit stellt die Gefäßfreiheit der Cornea dar, welche durch die umgebenden Gefäße, die Tränenflüssigkeit und das Kammerwasser mithilfe von Diffusion mit Glucose und Sauerstoff versorgt wird.

Die humane Cornea besteht aus fünf Schichten (siehe Abbildungen 1.2 und 1.1). Dabei werden von außen nach innen unterschieden:

- vorderes Hornhautepithel (Epithelium anterius corneae)
- Bowmansche-Membran (Lamina limitans anterior)
- Stroma (Substantia proprea)
- Descemetsche-Membran (Lamina limitans posterior)
- Endothel (Epithelium posterius corneae)



**Abbildung 1.1:** Anatomie des Auges [Williams 2007]



**Abbildung 1.2:** Zellschichten der Cornea [George 2004]

Das Epithel ist ein unverhornendes Plattenepithel und besteht aus 5-6 Epithelzellschichten. Es dient dem mechanischen Schutz der Cornea und der Keimabwehr.

Beim Mensch sitzt das Epithel der Bowmanschen-Membran auf, die dem Haussäugetier und damit dem Schwein fehlt. Die Bowmansche-Membran besteht aus Kollagenfibrillen und Proteoglykanen und steht so in engem Kontakt zum Stroma. Das Stroma macht ca. 90% der gesamten Hornhautdicke aus und besteht aus Kollagenfaserbündeln, Keratozyten und wässriger Grundsubstanz, die Proteoglykane enthält. Diese sind in der Lage Wasser zu binden und halten so die Brechungsindizes von Kollagenfaserbündeln und Grundsubstanz auf gleichem Niveau. Die Kollagenfaserbündel sind parallel und im Winkel zueinander angeordnet und bilden ein gleichmäßiges Gitter, das der Cornea Stabilität verleiht. Diese Anordnung und das streng regulierte Wassergleichgewicht sind wichtige Voraussetzungen für die Transparenz der Cornea.

Auf der Stromainnenseite schließt sich die Descemetsche-Membran an, die dem Corneaendothel als Basalmembran dient und aus Kollagenfasern in einer Grundsubstanz besteht. Diese Kollagenfasern verleihen ihr Stabilität und schützen das Endothel vor Verletzungen.

Das Corneaendothel wird von einem einschichtigen Plattenepithel aus hexagonalen Zellen gebildet. Die Zellen sind eng miteinander verbunden und bilden eine für das Kammerwasser durchlässige Barriere, die endotheliale Pumpen zur Regulation des stromalen Wasserhaushalts enthält.

Der stromale Wasserhaushalt wird durch Diffusion und endotheliale Pumpen (Na-K-ATPasen) reguliert. Bei übermäßiger Wasseraufnahme in das Stroma, die durch Endothelschäden hervorgerufen werden kann, entstehen Spalträume zwischen den Faserbündeln. Die gleichmäßige Anordnung der Lamellen geht verloren, was zu einer Corneatrübung und somit zu einem Transparenzverlust führt.

## **1.2 Geschichte der Transplantation**

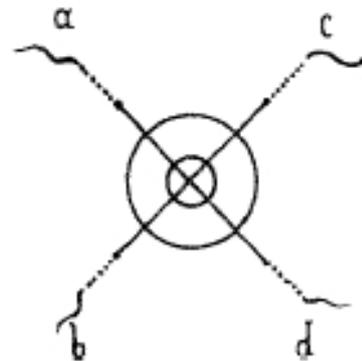
Gegenwärtig sind Erkrankungen, die eine Narbenbildung oder Trübung der Cornea bedingen, weltweit die häufigste Ursache für eine Erblindung. Die Corneatransplantation (Keratoplastik) ist die einzige Form der Therapie für viele die Cornea betreffende Erkrankungen [George 2004].

Bei der Einführung der Keratoplastik dominierten vor allem kosmetische Gründe, die die Deformierung oder Trübung der Cornea deutlich reduzierten, das Sehvermögen jedoch nicht verbesserten [Zirm 1906]. Heute steht die bestmögliche Wiederherstellung der Sehfähigkeit im Vordergrund. Die Indikationen sind vielschichtig und beinhalten Corneatrübung, Keratoconus, infektiös bedingte Corneanarbenbildung, Corneadystrophie, Trau-

mata und nicht zuletzt fehlgeschlagene, vorangegangene Corneatransplantationen. Verfahrenstechnisch wird die totale Keratoplastik, bei der sämtliche Corneaschichten ersetzt werden, von der lamellären Keratoplastik unterschieden. Die lamelläre Keratoplastik wird weiter untergliedert in eine anteriore, bei der das Corneaendothel des Empfängers erhalten bleibt, und eine posteriore, auf die im Weiteren näher eingegangen wird. Die anteriore Keratoplastik findet vor allem Anwendung bei Keratoconus oder Narbenbildung der anterioren Corneaschichten [Williams 2007].

Die erste erfolgreiche totale Keratoplastik am Menschen wurde 1906 von Dr. Eduard Zirm durchgeführt. Dabei wurden einem 45 Jahre alten Mann, dessen Corneae durch einen Löschkalkunfall vollständig undurchsichtig geworden waren, Corneateile eines 11-jährigen Jungen in beide Augen transplantiert. Die Operation des rechten Auges war nicht erfolgreich. Die der linken Seite war Grundlage für die heute noch durchgeführte penetrierende Keratoplastik.

Zirm trepanierte einen zentralen, runden Teil der Cornea des Empfängers heraus und ersetzte diesen durch einen zentralen Teil der Donorcornea von identischer Größe. Dieser wurde mit 2 skleralen Haltefäden in Position gehalten (siehe Abbildung 1.3). Die Durchsichtigkeit der linken transplantierten Cornea war nach 7 Monaten noch vollständig erhalten [Zirm 1906].

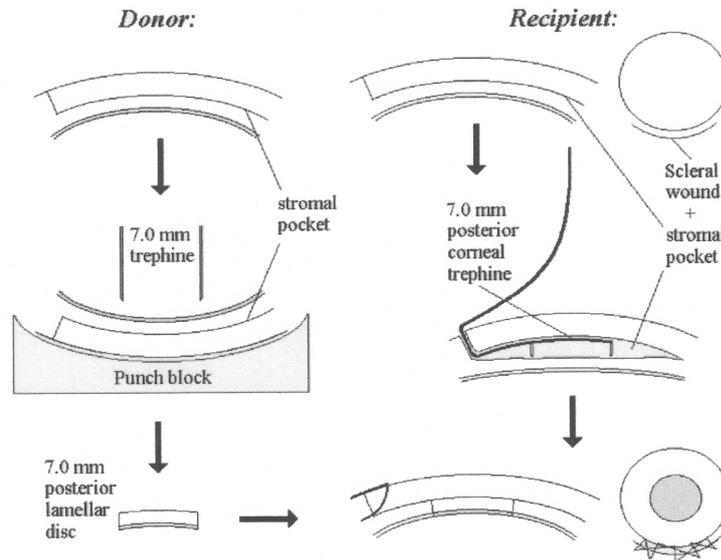


Von der posterioren lamellären Keratoplastik (PLK), auch endotheliale Keratoplastik (EK) genannt, werden zwei Operationsvarianten durchgeführt. **Abbildung 1.3:** sklerale Haltefäden nach Zirm [Zirm 1906]

Polack et al. beschrieben die Flap-Technik bereits 1965 [Terry 2006]. Dabei wurde ein Deckel (Flap) aus dem Epithel heraus trepaniert, das Stroma entfernt, das Endothel ersetzt und anschließend der Epitheldeckel mithilfe von Einzelheften wieder verschlossen [Terry 2006].

1999 führten Melles et al. die limbale Technik erstmals beim Menschen durch, die in den USA als deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK) bekannt wurde [Melles 1999]. Der Zugang zur vorderen Augenkammer erfolgte durch einen 9 mm langen limbalen-skleralen Schnitt. Durch diesen wurde das Corneagewebe in ca. 50-95% Stromatiefe mithilfe eines Trepans durchtrennt und die Stroma-Endothelschicht entfernt (siehe Abbildung 1.4). Das Transplantat wurde in gefalteter Form durch den limbalen Schnitt inse-

riert, welcher anschließend vernäht wurde.

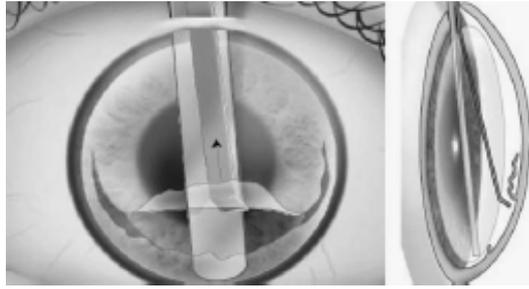


**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der DLEK. Nach Bildung einer stromalen Tasche wird mithilfe eines speziellen Trephans ein Teil der Stroma-Endothelschicht entfernt und durch ein heraufgetrepaniertes Stück der Spendercornea ersetzt. Der sklerale Zugang wird anschließend vernäht. [Melles 1999]

Vorteile der limbalen Technik sind u.a. die kürzere OP-Dauer, geringeres Astigmatismusrisiko und die Verhinderung der Naht-induzierten Vaskularisierung der Cornea, wie dies bei der Flap-Technik der Fall ist.

Seit ihrer ersten Vorstellung 1999 wurde die DLEK modifiziert. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Verkleinerung des limbalen Schnitts und auf der dadurch bedingten stärkeren Faltung des Transplantats. So wendeten Melles et al. 2000 erstmals eine 5 mm selbstverschließende Schnittmethode an, die seit 2005 in den USA sehr populär geworden ist [Terry 2006].

Melles et al. stellten 2004 eine weitere Technik vor, bei der das Stroma des Empfängers unangetastet blieb, da dieses in der Regel bei cornealen Dysfunktionen nicht betroffen ist [Melles 2004]. Sie nannten dieses Verfahren Descemetorhexis (DM), welches jedoch auch als Descemet's-stripping endothelial keratoplasty (DSEK) bekannt wurde [Price 2006]. Dabei wurde nur die Descemet'sche Membran mit anhaftendem Endothel vom Empfängerauge entfernt und durch ein Transplantat ersetzt (siehe Abbildung 1.5). Dieses Verfahren lieferte eine glattere optische Zwischenschicht, eliminierte die Trü-



**Abbildung 1.5:** Descemtorhexis: graphische Darstellung von der Entfernung der Descemet'schen Membran mit anhaftendem Endothel [Melles 2004]

bungsgefahr an der Schnittkante des Stromas und verbesserte so die optische Durchsichtigkeit gegenüber der DLEK. Außerdem wurde so die Operationsdauer aufgrund der einfacheren Technik deutlich verkürzt [Melles 2004]. Price et al. und andere berichteten jedoch bereits von Dislokationsraten von mehr als 50%, die somit deutlich über denen der DLEK liegen [Price 2006]. Auch ist die Descemet'sche Membran mit anhaftendem Endothel deutlich fragiler, und es besteht somit die Gefahr von Zellzerstörung, bedingt durch Faltenbildung [Terry 2006].

### 1.3 Geschichte der Konservierung

Eine Konservierung der Cornea ist nötig, um den Zeitraum zwischen Entnahme und Transplantation zu überbrücken. Eine Ausdehnung dieses Zeitraums ermöglicht den Transport über längere Distanzen, die antibiotische Vorbereitung des Empfängers, die optimale Abstimmung von Empfänger und Spender (Gewebetypisierung), die Kontaminationsdetektion bzw. mikrobielle Untersuchungen des Spendermaterials, sowie eine bessere OP-Planung. Je länger der Zeitraum zwischen Organentnahme und -transplantation mit optimaler Endothelerhaltung sein kann, desto gründlicher lässt sich die Transplantation vorbereiten. Auch kann so eine dauerhafte Corneatransplantatverfügbarkeit ermöglicht werden.

Corneakonservierungsmedien müssen in der Lage sein, ein intaktes, funktionierendes Endothel zu bewahren, da diese Schicht für die Erhaltung der Transparenz der Cornea verantwortlich ist. Die Corneatransparenz ist bedingt durch die Anordnung ihrer Proteinbestandteile (Kollagen und Proteoglykane) und einen streng definierten Wassergehalt des Stromas. Eine herabgesetzte endotheliale Pumpleistung durch Endothelschäden und nur begrenzt mögliche Endothelzellregeneration (siehe Kapitel 4.4.2) führt zu einer Störung

des stromalen Wasserhaushalts, einer damit einhergehenden Quellung des Stromas und resultiert in einem Transparenzverlust der gesamten Cornea. Somit kommt dem Erhalt des Corneaendothels während der Konservierung eine besondere Bedeutung zu.

Die Einführung von Konservierungsmedien zur Lagerung isolierter Corneae führte zu einer Verlängerung der Lagerdauer, da das Endothel aufgrund des direkten Mediumkontakts besser erhalten werden konnte.

Zur Konservierung der Cornea finden heute zwei unterschiedliche Verfahren Anwendung: die hypotherme Lagerung bei 2-6°C, die v.a. in den USA durchgeführt wird, und die hauptsächlich in Europa durchgeführte Organkultur bei 31-37°C. Dabei bietet das aufwändigere Organkulturverfahren neben der prinzipiell längeren Lagerungsdauer (einige Wochen) bei sehr großer Varianz der Zellverluste [Pels/Schuchard 1983] den Vorteil einer leichteren Kontaminationsdetektion durch die Aufrechterhaltung der Stoffwechselforgänge, die bei der hypothermen Lagerung aufgrund der herabgesetzten Stoffwechselfunktionen nicht gegeben ist. Der materielle Aufwand bei der hypothermen Lagerung ist deutlich geringer als bei der Organkultur und es bedarf keines speziell geschulten Personals zur Mediumkontrolle, Kontaminationsdetektion und Sterilitätseinhaltung.

### **1.3.1 Hypotherme Lagerung**

1935 führten Filatov et al. die Lagerung von zur Transplantation bestimmten enukleierten Bulbi in einer feuchten Kammer ein [Filatov 1935]. Dabei wurden die vollständig intakten Bulbi in sterilen, fest zu verschließenden Gefäßen bei 4°C gelagert. Die Gefäße waren mit feuchtem Zellstoff ausgelegt, um eine Gewebeaustrocknung zu verhindern. Die so beibehaltene Exposition des Endothels gegenüber dem Kammerwasser begrenzte die mögliche Lagerdauer aufgrund der entstehenden autolytischen Produkte auf 24-36 Stunden post mortem [Chu 2000].

Die Einführung von MK-Medium zur Lagerung isolierter Corneae brachte eine bessere Endothelerhaltung und ermöglichte eine Verlängerung der Lagerdauer. MK-Medium basierte auf Medium 199 und enthielt 5% Dextran 40 als Entquellungszusatz, sowie Penicillin und Streptomycin als Antibiotika bzw. -mykotika [McCarey/Kaufman 1974]. McCarey und Kaufman berichteten von vitalem Endothel von Kaninchencorneae nach bis zu 14-tägiger Lagerung in MK-Medium und führten dies auf die Entfernung des Kammerwassers und die damit einhergehende Endothelexposition gegenüber MK-Medium zurück. Humane Corneae wurden bis zu 4 Tage in MK-Medium gelagert [Means 1995, Kaufman 1985], wobei über den Erfolg nicht berichtet wird.

Die Entwicklung von K-Sol, einem modifizierten MK-Medium, erfolgte 1985 erneut durch Kaufman [Kaufman 1985]. Der Ersatz von Dextran durch das ebenfalls entquellende Chondroitinsulfat und die Addition von HEPES-Puffer führten zu einer weiteren Verlängerung der Cornealagerung auf bis zu 14 Tage, wobei über den Erfolg nicht berichtet wird. Der klinische Einsatz wurde jedoch auf 7 Tage begrenzt [Chu 2000], Gründe dafür werden jedoch nicht genannt.

1986 stellten Lindstrom et al. das Closed Minnesota System Medium (CSM) vor, auf der Basis von Minimum Essential Medium (MEM), mit einem reduzierten Chondroitinsulfatgehalt von 1,35%, welches aufgrund von verstärktem Aufquellen und Auftreten von Endothelschäden nicht umfassend klinisch genutzt wurde [Lindstrom 1986].

CSM lieferte jedoch 1988 die Grundlage für Dexsol, dem 1% Dextran, zur Steigerung der entquellenden Wirkung zugesetzt wurde [Skelnik 1988]. Dexsol wurde umfassend eingesetzt und ermöglichte eine Konservierung für 10 Tage [Walkenbach 1991, Kaufman 1991], über den Erfolg wird nicht berichtet. Dexsol ist heutzutage jedoch nicht mehr kommerziell erhältlich.

Die derzeit meist genutzten Konservierungslösungen zur hypothermen Lagerung sind Optisol-GS (Fa. Bausch & Lomb; Rochester, NY, USA) und Chen-Medium [Chen 1994], auf die in dieser Arbeit näher eingegangen wird (siehe Kapitel 2.4) [Jeng 2006].

### **1.3.2 Organkulturlagerung**

Die Lagerung von isolierten Corneae in Organkultur bei 37°C wurde 1976 durch Doughman et al. eingeführt [Doughman 1976]. Das Organkulturmedium basierte auf MEM und enthielt fetal calf serum (FCS) und Antibiotika. Es enthielt keine entquellenden Substanzen, weshalb sich eine Entquellung in MK-Medium bei 4°C der Organkulturrkonservierung anschloss [Doughman 1982].

Eine Modifizierung erfolgte 1983 durch Pels et al., bei der die Corneae in Dextran enthaltendem Medium bei 31°C im Anschluss an die Organkultur für 24 Stunden entquollen wurden [Pels/Schuchard 1983]. Dieses heute noch bewährte Verfahren ermöglicht eine Lagerung für mehrere Wochen, der sich eine Lagerung in entquellenden Medien vor der Transplantation anschließt. Trotz des weitverbreiteten Einsatzes in Europa, wird über den Erfolg der mehrwöchigen Lagerung nur sehr spärlich berichtet (siehe Kapitel 4.4.2).

## 1.4 Versuchsziele

In unseren Versuchen werden zwei hypotherme Konservierungsmedien, Optisol-GS und Chen-Medium, und ein Organkulturmedium für Corneatransplantate bezüglich der Qualität und Integrität des Corneaendothels nach erfolgter Lagerung für 7 und 14 Tage verglichen. Nach 1-tägiger Entquellung im Anschluss an die Lagerung erfolgen die Evaluierungen der Zelldichte, der Zellvitalität und der Corneadicke mikroskopisch.

Die Adeninnukleotide werden mithilfe der HPLC bestimmt und zur Beurteilung des Stoffwechselzustands der Endothelzellen und der Fähigkeit zur Regeneration herangezogen. Ziel dieser Dissertation ist die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die Humanmedizin, um die Konservierungsergebnisse von zur Transplantation bestimmten Corneae zu optimieren. So kann der Zeitraum zwischen Entnahme und Transplantation des Organs, nach dem noch ein optimales Transplantat zur Verfügung steht, besser definiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewinnung der Schweineaugen

Die Schweineaugen stammten aus gewerblicher Schlachtung (Fleischversorgung Köln, Liebigstr. 120). Die Eukleation nach Betäubung der Tiere erfolgte durch den Schlachter. Die Bulbi wurden unmittelbar in ca. 37°C warme, zuvor mit Carbogen (95% Sauerstoff + 5% Kohlendioxid, Fa. Linde Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim) begaste Krebs-Henseleit-Lösung (Tabelle 2.1) verbracht und darin transportiert. Bis zur Bulbusdesinfektion wurde diese Aufbewahrungslösung mittels einer Begasungsfritte weiterhin mit Carbogen begast, um den pH-Wert der Lösung konstant bei ca. 7,4 zu halten.

<b>Krebs-Henseleit-Lösung</b>	
Na <sup>+</sup>	143,1 mmol/l
K <sup>+</sup>	5,9 mmol/l
Ca <sup>2+</sup>	1,6 mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	1,2 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	125,9 mmol/l
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,0 mmol/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,2 mmol/l
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,2 mmol/l
Glucose	5,1 mmol/l

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

### 2.2 Aufbereitung der Cornea

#### 2.2.1 Bulbusdesinfektion

Der Bulbus wurde zur Reduzierung von Proteinfehlern während der Desinfektion zunächst von Muskeln und Konjunktiva befreit. Die Desinfektion erfolgte in zwei Schritten. Der Bulbus wurde zuerst 2 Minuten in 0,5% Polyvinylpyrrolidon-Iodine (in A. dest. ge-

löst) und dann 1 Minute in 0,1% Na-Thiosulfat (in 0,2 mol PBS gelöst) desinfiziert.

<b>0,2 mol PBS</b>	
Na <sup>+</sup>	498,5 mmol/l
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	37,7 mmol/l
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	80,4 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	300,0 mmol/l

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung der 0,2 mol PBS; der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt (pH-Meter 766 Calimatic, Fa. Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co, Berlin)

Alle folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Herasafe, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) statt.

### 2.2.2 Corneaexzision

Die Corneaexzision erfolgte spätestens 3 Stunden nach E nukleation. Um eine übermäßige Ödematisierung des Corneaendothels an den Schnittkanten während der Lagerung zu vermeiden, wurde die Cornea mit einem ca. 2 mm breiten Sklerarand aus dem Bulbus heraus getrennt. Dazu wurde der Bulbus mit einer Moskitoklemme am Nervus opticus stabilisiert und in einer Nierenschale, deren Boden zur Verhinderung von Austrocknung mit 0,9% NaCl-Lösung bedeckt war, fixiert. Der Eröffnungsschnitt in der Sklera wurde mit einem spitzen Skalpell begonnen und zirkulär mit einer spitzen Schere fortgeführt. Die heraus getrennte Cornea wurde nun mit einer feinen anatomischen Pinzette am Sklerarand gefasst und das Corpus ciliare unter Schonung des Endothels mit Hilfe einer zweiten feinen anatomischen Pinzette sauber abgezogen. Die Lagerung der so isolierten Cornea in Medium schloss unmittelbar an.

## 2.3 Gruppeneinteilung

Die Lagerung der Corneae fand in Organkulturlösung bei 34°C und 5% CO<sub>2</sub> oder in Chen- bzw. Optisol-Lösung bei 4°C statt.

Die Lagerung in den jeweiligen Medien erfolgte für 7 oder 14 Tage. Anschließend daran wurden die Corneae für einen Tag in Entquellmedium bei 34°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

Zur Erstellung einer Vergleichsgruppe ohne Konservierung wurden Corneae nach 1-tägiger Lagerung im Entquellmedium als Kontrollgruppe verwendet.

Die Corneae jeder Gruppe wurden anschließend an die Lagerung der Trypanblau/ Alizarinrot-Färbung oder der Adeninnukleotidmessung mittels HPLC unterzogen.

Kontaminierte Corneae wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dies war der Fall, wenn das Medium verfärbt, getrübt oder Pilzwachstum makroskopisch oder mikroskopisch festzustellen war.

	<b>Gruppen</b>	<b>Lagerungsdauer</b>	<b>Färbung</b>	<b>HPLC</b>
	ohne Lagerung	0 Tage	33	9
Kontrolle	Entquellmedium	1 Tag	16	10
Lagerung	Organkulturlösung	7 Tage	13	9
		14 Tage	16	14
	Chen-Lösung	7 Tage	18	11
		14 Tage	16	10
	Optisol-Lösung	7 Tage	15	10
		14 Tage	15	12

**Tabelle 2.3:** Gruppenaufteilung und Anzahl der Proben

## 2.4 Lagerung der Cornea

Unter der Sterilbank erfolgte die Sterilfiltration der selbst hergestellten Medien mit einem 0,22  $\mu\text{m}$  Membranfilter. Je 8 ml der sterilen Organkulturlösung wurden anschließend in 6-Loch-Platten vorgelegt, mit je einer Cornea versehen und bei 34°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator (HeraCell, Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau) gelagert. Da die Lagerung bei 4°C in einem Kühlschrank nicht unter sterilen Bedingungen möglich ist, erfolgte die Abfüllung von je 8 ml sterilem Chen-Medium und die Corneabestückung in vollständig verschließbare 50 ml Falcon-Röhrchen. Die Optisol GS-Lösung (Fa. Bausch & Lomb; Rochester, NY, USA) wurde steril in durch Schraubverschlüsse verschließbaren Gefäßen geliefert und wurde somit nur noch unter sterilen Bedingungen mit Corneae bestückt. Die Lagerung der Corneae in Optisol erfolgte ebenfalls bei 4°C im Kühlschrank.

Die Zusammensetzungen des Entquellmediums, des Organkulturmediums und des Chen-Mediums sind in den Tabellen 2.5, 2.7 und 2.6 aufgeführt.

Optisol-GS basiert auf einer Mischung aus Medium 199 und MEM und enthält Bestandteile von nicht-essentiellen Aminosäuren, Mercaptoethanol, Pyruvat, Dextran, Chondroitinsulfat, sowie Komponenten, die als ATP-Vorläufer fungieren sollen [Chen 1999]. Genauere Angaben zu Optisol-GS können nicht gemacht werden, da das Rezept patentiert ist. Die Lösung wurde somit gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen.

<b>Medium 199</b>	
Na <sup>+</sup>	118,0 mmol/l
K <sup>+</sup>	5,4 mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	0,8 mmol/l
Ca <sup>2+</sup>	1,8 mmol/l
Fe <sup>3+</sup>	1,8 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	125,3 mmol/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,8 mmol/l
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,0 mmol/l
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,3 mmol/l
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	0,6 mmol/l
+ verschiedene Aminosäuren und Vitamine	

**Tabelle 2.4:** Bestandteile von Medium 199 (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

<b>Entquellmedium</b>		
Hepes	15,0	mmol/l
Phenolrot	0,5	mmol/l
Adenosin	1,0	mmol/l
Penicillin	0,2	mmol/l
L-Glutamin	0,2	mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,6	mmol/l
Nystatin	10,0	μmol/l
Streptomycin	70,0	μmol/l
HES 200/0,5	75,0	g/l

**Tabelle 2.5:** Zusammensetzung des Entquellmediums auf Basis von Medium 199, der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt

Chen-Medium		
Hepes	25,2	mmol/l
Phenolrot	0,5	mmol/l
$\beta$ -Hydroxybutyrat	10,0	mmol/l
Penicillin	0,2	mmol/l
L-Glutamin	0,2	mmol/l
Nystatin	10,0	$\mu$ mol/l
Streptomycin	70,0	$\mu$ mol/l
HES 200/0,5	60,0	g/l

**Tabelle 2.6:** Zusammensetzung des Chen-Mediums [Chen 1999] auf Basis von 2/3 Medium 199 und 1/3 A. dest.; Modifizierung: Dextran wurde durch HES ersetzt; der pH-Wert wurde bei 4°C auf 7,35 eingestellt

Organkulturlösung		
Hepes	15,0	mmol/l
Phenolrot	0,5	mmol/l
Adenosin	1,0	mmol/l
Penicillin	0,2	mmol/l
L-Glutamin	0,2	mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,6	mmol/l
Gentamycin	0,1	mmol/l
Nystatin	10,0	$\mu$ mol/l
Streptomycin	70,0	$\mu$ mol/l
FCS	100,0	ml/l

**Tabelle 2.7:** Zusammensetzung der Organkulturlösung auf Basis von Medium 199, der pH-Wert wurde auf 7,2, den in Literatur empfohlenen, eingestellt [van der Want 1983]

## 2.5 Endothelfärbung

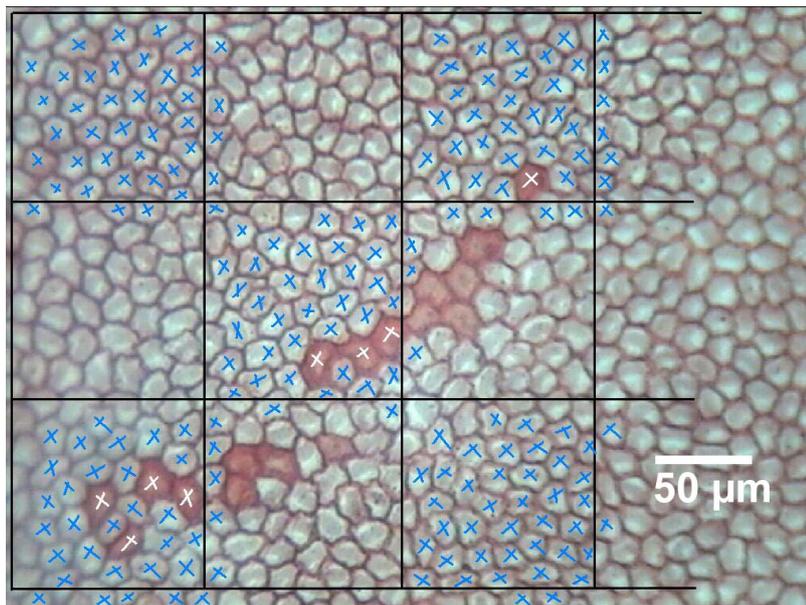
Nach Entnahme aus dem Entquellmedium wurde die Cornea am Skleraring mit einer feinen Pinzette gefasst und senkrecht gehalten. Ablaufende Mediumreste wurden am unteren Sklerarand mithilfe eines Tupfers aufgefangen. Dieser Prozess wiederholte sich vor jedem Auftragen von Lösungen auf das Endothel. Die entquollene Cornea wurde mit der konkav gewölbten Endothelseite nach oben in eine Petrischale gelegt. Auf die abgetrocknete Endotheloberfläche wurde nun tropfenweise 1% Alizerin-rot-S (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (siehe Tabelle 2.8) gegeben und für 2 Minuten einwirken gelassen. Es folgte eine Spülung der Cornea in 0,9% NaCl-Lösung. Zur Fixierung der Zellen wurde 99% Äthanol für 30 Sekunden aufgetragen und anschließend erneut mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Die Gegenfärbung mit 0,25% Trypanblau (Certistain ®, Fa. Merck, Darmstadt) (siehe Tabelle 2.8) wurde nach 1 Minute durch Spülung in 0,9% NaCl-

Lösung gestoppt [Sperling 1976]. Zur Verhinderung von Endothelaustrocknung wurden die Cornea tropfenweise mit 0,9% Natriumchloridlösung benetzt und anschließend mikroskopiert.

Alizarin-rot-S 1%	Der Farbstoff wurde in 0,9% NaCl-Lösung gelöst. Zur Erhöhung der Löslichkeit wurde die Lösung während des Rührens erhitzt ( $< 60^{\circ}\text{C}$ ) und anschließend auf einen pH von 4,2 eingestellt [Taylor/Hunt 1981].
Trypanblau 0,25%	Der Farbstoff wurde in 0,9% NaCl-Lösung gelöst.

**Tabelle 2.8:** Herstellung der Färbelösungen

### 2.5.1 Evaluation der Zelldichte



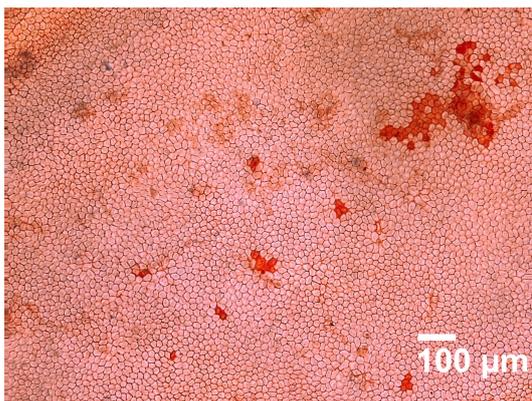
**Abbildung 2.1:** Schema der Zellzählung: Die blauen Kreuze kennzeichnen die intakten Zellen und die weißen Kreuze die defekten Zellen.

Die Zellzahl wurde mittels digitaler Fotografie dokumentiert. Dazu wurde ein Lichtmikroskop (Orthoplan, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit einer Okularkamera (Ocu-Cam, Fa. PCE, Dietmannsried) ausgestattet. Es folgte die Ermittlung des Anteils der intakten Teilbereiche der Gesamtcornea und dieser wurde in Prozent ausgedrückt. Anschließend wurden

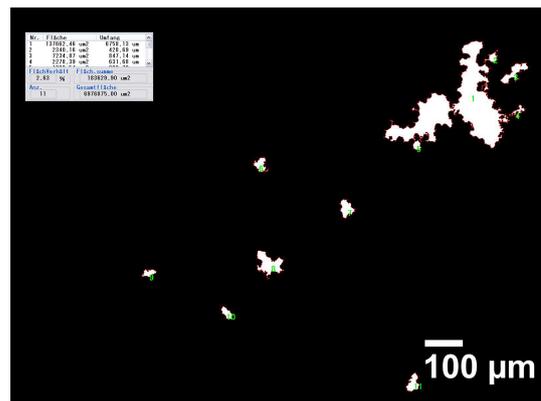
von 5 zufällig gewählten Bereichen des gefärbten Endothels mit 10fach vergrößerndem Objektiv Fotografien angefertigt. Diese wurden ausgedruckt und mit einer Rasterschablone versehen, deren Felder 6,5 cm x 6,5 cm groß waren. Dies entspricht 0,1 x 0,1 mm und somit einer Feldfläche von 0,01 mm<sup>2</sup>. Die Zahl der intakten und der defekten Zellen bzw. Zellverlusten von 5 dieser Felder wurde ermittelt, wobei die die Rastergrenze überschreitenden Zellen nur an der rechten und unteren Seite eines Quadrates in die Zählung eingingen (siehe Abbildung 2.1). Aus 5 Quadraten von 5 Cornearegionen wurde die mittlere Zellzahl ermittelt und pro mm<sup>2</sup> angegeben.

### 2.5.2 Flächenmessung der intakten Teilbereiche

Die Flächeninhalte der intakten Teilbereiche können mit einem Digital-Mikroskop (VHX-500FD, Fa. Keyence Corporation, Osaka, Japan) gemessen werden. Dabei werden die Bilder der einzelnen Schärfeebenen des Corneaendothels zu einem scharfen Abbild zusammengesetzt (siehe Abbildung 2.2). Die Berechnung der einzelnen Flächen erfolgt automatisch nach Schwarz-Weiß-Markierung. Dabei wird die Fläche der einzelnen nummerierten weißen Bereiche berechnet, die daraus resultierende Gesamtfläche errechnet und das Verhältnis von schwarzer zu weißer Fläche dargestellt (siehe Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.2:** Scharfes Abbild der einzelnen Schärfeebenen des Corneaendothels nach 14-tägiger Lagerung in Chen-Medium und Färbung mit Alizarin-Rot und Trpanblau



**Abbildung 2.3:** gleiches Corneaendothel wie in Abb. 2.2 nach Schwarz-Weiß-Markierung nach 14-tägiger Lagerung in Chen

### **2.5.3 Ermittlung der Corneadicke**

Nach Abschluss der mikroskopischen Zellzahlermittlung wurde die Cornea mit einem Skalpell halbiert, so dass eine schräge Schnittfläche entstand. Dies erleichterte die nachfolgend beschriebenen Einstellungen. Mit dem 10fach vergrößernden Objektiv wurde nun auf die obere Kante der Schnittfläche fokussiert. Unter Sichtkontrolle wurde die Fokussierung auf die untere Kante der Schnittfläche verlagert, wobei die dazu benötigten Umdrehungen der Mikrometerschraube des Mikroskops aus 3 Messwiederholungen gezählt wurden. Eigene Untersuchungen haben ergeben, dass eine volle Umdrehung der Mikrometerschraube  $176 \mu\text{m}$  entspricht. Somit ließ sich die Dicke der Cornea rechnerisch ermitteln.

## **2.6 Adeninnukleotidmessung**

### **2.6.1 Deproteinierung**

Eiskalte  $0,3 \text{ mol}$  Perchlorsäure sorgte für die vollständige Fällung der Proteine. Dazu wurde die Cornea wie bereits beschrieben mithilfe eines Tupfers abgetrocknet und mit dem Endothel nach oben in eine Petrischale auf Eis gelegt. In die konkave Innenseite der Cornea wurden  $50 \mu\text{l}$   $0,3 \text{ mol}$  Perchlorsäure tropfenweise gefüllt und 20 Minuten darauf belassen. Anschließend wurde der Überstand in ein Eppendorfgefäß aufgenommen und erneut  $50 \mu\text{l}$  der Perchlorsäure für 2 Minuten aufgegeben. Während dieser Zeit wurde über die Endotheloberfläche mit einem Plastikspatel gerieben, um die Auflösung der Zellmembran mechanisch zu unterstützen. Nach Aufnahme des Überstandes in das Eppendorfgefäß wurde die 2-minütige Perchlorsäurebehandlung unter Reibung noch zweimal wiederholt, so dass insgesamt  $200 \mu\text{l}$  zur Eiweißfällung und Extraktion des Endothels benutzt wurden.

Der in dem Eppendorfgefäß gesammelte Perchlorsäureextrakt wurde bei  $13\ 200$  Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge (5415D, Fa. Eppendorf AG, Hamburg) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Mengenermittlung mit der Mikropipette in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

## 2.6.2 Probenaufbereitung für die HPLC

Nach Neutralisierung mit 10% 2 n KOH, erfolgte die pH-Einstellung des Überstandes auf 7,0 auf Eis. Die dazu benötigte Volumenmenge wurde notiert, zur Berechnung des Verdünnungsfaktors der Adeninnukleotide.

Zum Absetzen von Perchloraten, die die HPLC-Messung stören würden, wurde die Probe anschließend für mindestens 24 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend erfolgte sofort die Einspritzung in die HPLC.

## 2.6.3 High Performance Liquid Chromatography

Der Gehalt an ATP, ADP und AMP wurde mittels HPLC aus den Peakflächen ermittelt. Die Peakidentifikation erfolgte über die Retentionszeit und die individuellen Spektren der Adeninnukleotide [Fischer 1995]. Dazu wurden  $40\ \mu\text{l}$  der aufbereiteten Probe über einen Autosampler in das System eingespritzt.

Das System bestand aus 7 Einzelementen (Elemente 1-6: Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt; Element 7: Fa. Jour research, Onsala, Schweden):

1. AS-2000 Autosampler
2. L-6200 Intelligentpump
3. T-6300 Column Thermostat & Säule  
(LiCrospher®100 RP-18 in LiChroCART®125-4)
4. L-4500A Diode Array Detector
5. L-4250 UV-VIS Detector
6. D-6000 Interface
7. Ecosaver

Bei dieser HPLC handelte es sich um eine Umkehr-Phasen Chromatographie.

Das verwendete Laufmittel auf Aqua dest. Basis setzte sich aus einem Puffer aus 26 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat und 0,57 mmol/l Dikaliumhydrogenphosphat, sowie aus 2 mmol/l 11-Aminoundekansäure zusammen und wurde mit 8% Methanol versetzt [Fischer 1995].

Das Laufmittel wurde in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gepumpt. Der pH-Wert des frisch angesetzten Laufmittels lag bei 6,4.

Die Peakidentifizierung erfolgte mithilfe des L-4500A Diode Array Detectors, der alle Wellenlängen misst und somit das Gesamtspektrum einer Substanz erfasst. Für die Wellenlängen 210, 250, 270 und 280 nm wurden die Einzelchromatogramme überlagert, wodurch sich für jeden Peak aus der Relation der 4 Wellenlängen zusammen mit der Retentionszeit leicht die zugrundeliegende Substanz erkennen ließ. Die computergestützte Integration der Peakflächen ermöglichte, im Vergleich zu den Peakflächen von Standardlösungen mit den entsprechenden Substanzen, die Konzentrationsbestimmung der Substanzen ATP, ADP und AMP in den Gewebeextrakten. Der L-4250 UV-VIS Detector erfasst nur eine Wellenlänge (in diesem Fall 210 nm), weist jedoch eine höhere Empfindlichkeit auf.

## 2.7 Trockengewichtbestimmung

Zur Ermittlung des Trockengewichts der Cornea wurde der Sklerarand von 6 ungelagerten Corneae nach abgeschlossener mikroskopischer Dickenmessung mit einer feinen Schere abgetrennt. Die Corneae wurden anschließend in einem Alubehältnis mit bekanntem Leergewicht gewogen und für 5-7 Tage bei  $-48^{\circ}\text{C}$  und einem Vakuum von 0,007 mbar gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Gamma 1-20, Fa. Christ, Osterode). Nach weiteren 24 Stunden bei  $100-130^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank (Fa. Memmert, Schwabach) wurde die Cornea mit Alugefäß erneut gewogen. Die Subtraktion des Alugefäßgewichtes ergab so das Trockengewicht der Cornea auf das die Ergebnisse der Adeninnukleotidmessungen bezogen wurden. Diese wurden in nmol/g Trockengewicht ausgedrückt.

## 2.8 statistische Aufbereitung

Die ermittelten intakten und defekten Zellzahlen wurden pro  $\text{mm}^2$  angegeben und anschließend auf die Gesamtcornea mit einer Fläche von  $79 \text{ mm}^2$  bezogen. Die Addition der ATP-, ADP- und AMP-Werte ergab die Summe der Adeninnukleotide (SAN). Mithilfe der SAN ließ sich das „energy charge potential“ ( $ECP = \frac{ATP + \frac{1}{2}ADP}{SAN}$ ) rechnerisch ermitteln. Das ECP gibt Auskunft über den Phosphorylierungsgrad der Adeninnukleotide [Atkinson 1968].

Die Datenverwaltung und die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel. Auch wurden Diagramme und Tabellen mit diesem Programm erstellt.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Primer of Biostatistics zur Hilfe genommen [Glantz 1992]. Zuerst wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Bei vorliegender Signifikanz (d.h.  $p < 0,05$ ) wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen untereinander der Student-Newman-Keuls Test herangezogen. Der Vergleich gegenüber einer Kontrollgruppe wurde mit dem Dunnett Test gezogen.



# 3 Ergebnisse

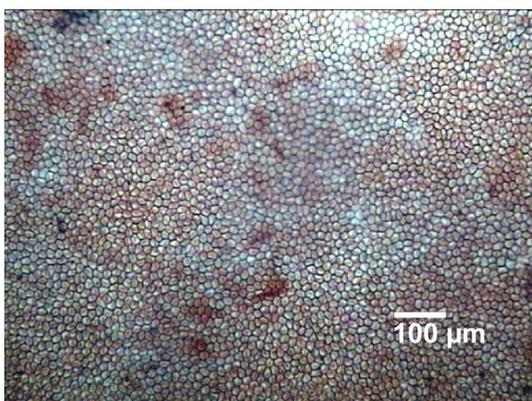
## 3.1 Mikroskopische Untersuchungen

### 3.1.1 intakte Teilbereiche der Gesamtcornea (in %)

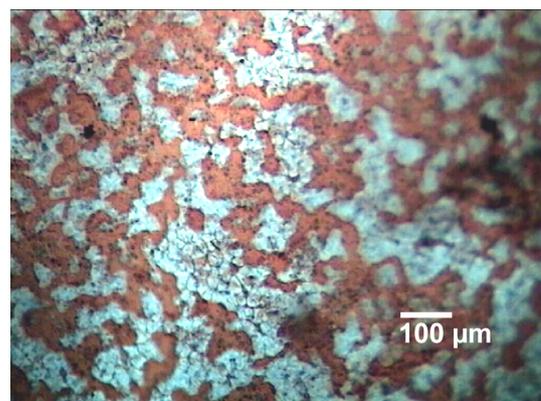
Die ermittelten intakten Bereiche in Prozent pro Gesamtcornea waren bei der Kontrollgruppe am höchsten und bei der 14-tägigen Lagerung in Optisol mit Abstand am niedrigsten (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.3).

Dabei gab es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Lagerungen in Optisol. Auch war die Reduktion der intakten Teilbereiche von der 7-tägigen zur 14-tägigen Lagerung in Optisol signifikant.

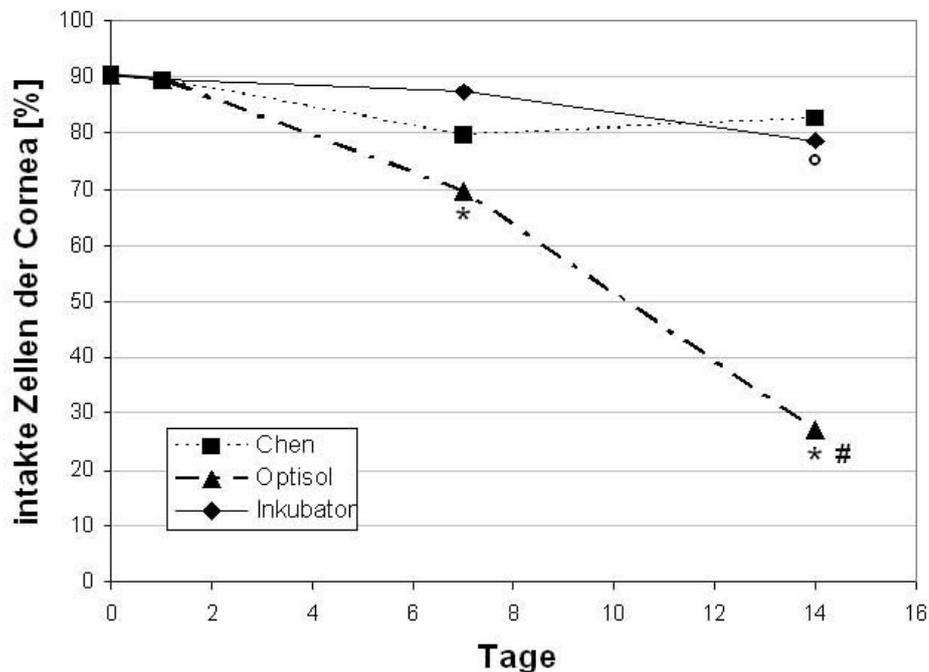
Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der 14-tägigen Lagerung in Optisol und den 14-tägigen Lagerungen im Inkubator und in Chen-Medium (siehe Abbildungen 3.1 und 3.2).



**Abbildung 3.1:** Ausschnittsaufnahme intakter Teilbereiche (100%) nach 14-tägiger Lagerung in Chen-Medium



**Abbildung 3.2:** Ausschnittsaufnahme intakter Teilbereiche (3%) nach 14-tägiger Lagerung in Optisol



**Abbildung 3.3:** %-Satz der intakten Teilbereiche, MW, Signifikanzen  $p < 0,05$  für: \* gegenüber 1 Tag Kontrolle, o gegenüber gleichlanger Lagerung in Optisol, # gegenüber gleichlanger Lagerung in Chen-Lösung; außerdem signifikanter Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen Lagerung in Optisol; SD vgl. Tabelle 3.1

### 3.1.2 Anzahl der vollständig defekten Corneae

Zu den vollständig defekten Corneae zählten Corneae mit prozentual-ermittelten intakten Teilbereichen von  $\leq 10\%$ .

Keine defekten Corneae waren bei der Kontrollgruppe und bei beiden Lagerungen in Chen-Medium zu finden.

Bei den Inkubatorlagerungen war jeweils eine Cornea vollständig defekt. Bei der 7-tägigen Lagerung ( $n=13$ ) waren es somit 8%, bei der 14-tägigen Lagerung ( $n=16$ ) 6% der jeweiligen Gesamtmenge.

Die höchsten Werte wurden bei der Lagerung in Optisol erreicht. Bei der 7-tägigen Lagerung waren es 3 defekte Corneae von 15, die somit 20% der Gesamtmenge ausmachten. Bei der 14-tägigen Lagerung in Optisol waren es sogar 9 von 15, also 60% der Gesamtmenge war vollständig defekt.

### 3.1.3 intakte und defekte Zellzahlen

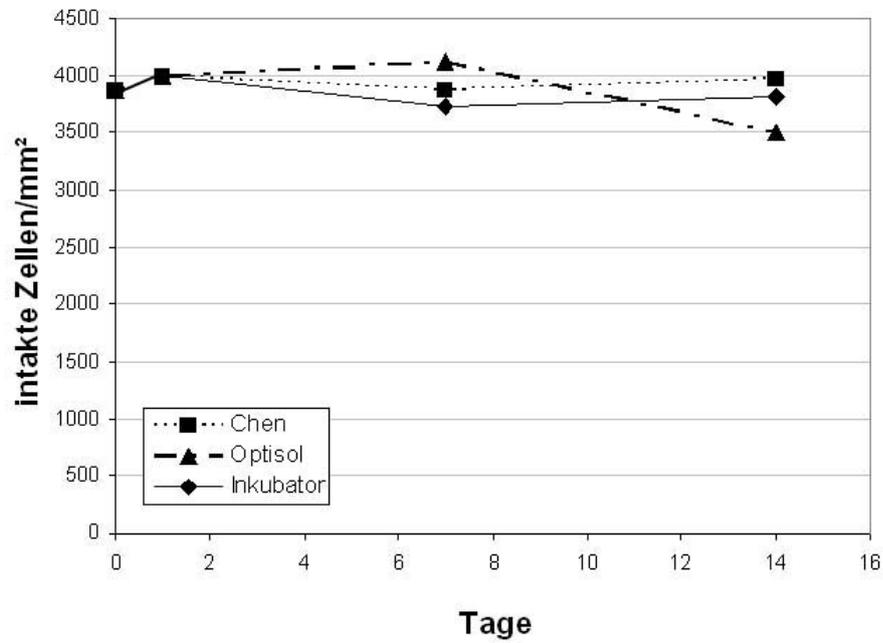


Abbildung 3.4: intakte Zellen in den intakten Teilbereichen, MW; SD vgl. Tabelle 3.1

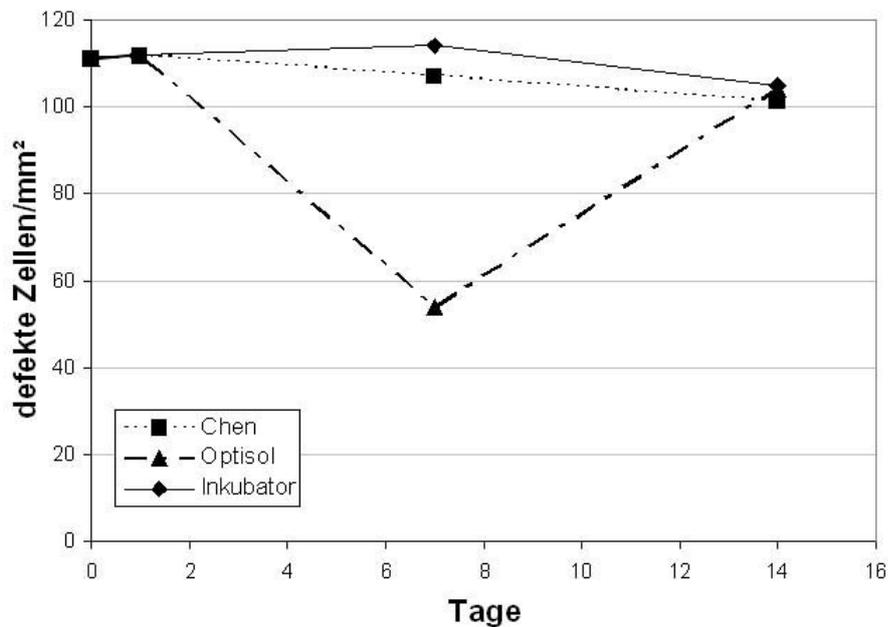
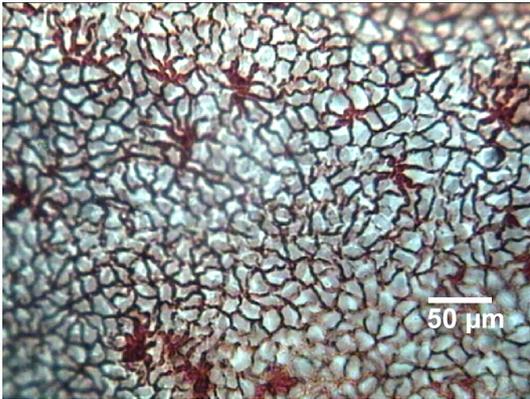


Abbildung 3.5: defekte Zellen in den intakten Teilbereichen, MW; SD vgl. Tabelle 3.1

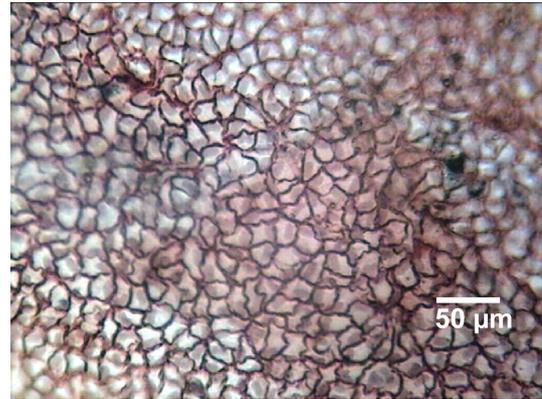
Die Zahl der intakten Zellen in den intakten Teilbereichen der Corneae konnte nur bei den Corneae bestimmt werden, bei denen noch mindestens 10% der Gesamtfläche intakt war (vgl. die unterschiedlichen n-Zahlen in Tabelle 3.1). Die Zahl der intakten Zellen schwankte nur geringfügig, ohne signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 3.4). Größere Unterschiede im Zeitverlauf fanden sich nur für die Lagerung in Optisol zwischen 7 und 14 Tagen. Auch dieser Unterschied war wegen der breiten Streuung nach 14 Tagen aber nicht signifikant.

Defekte Zellen fanden sich schon bei der frisch entnommenen Cornea in den sonst intakten Bereichen mit einer Häufigkeit von im Mittel  $110/\text{mm}^2$  (entsprechend ca. 3%) (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.5). Dieser Wert blieb auch nach 2 wöchiger Lagerung annähernd gleich und wich nur in einzelnen Corneae nach 7 Tagen Konservierung ab. Im Mittel war dieser Unterschied gegenüber den übrigen 7 Tage konservierten Gruppen aber nicht signifikant.

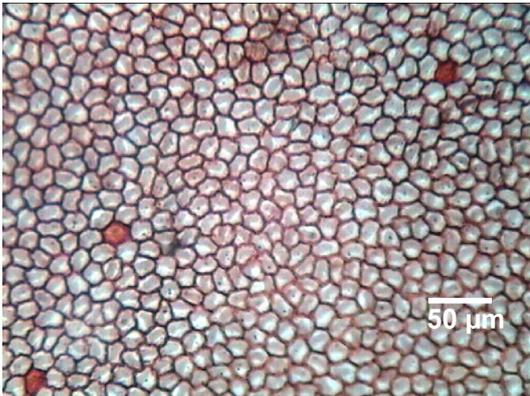
Abbildungen 3.6 bis 3.11 zeigen repräsentative Fotografien der einzelnen Lagerungen.



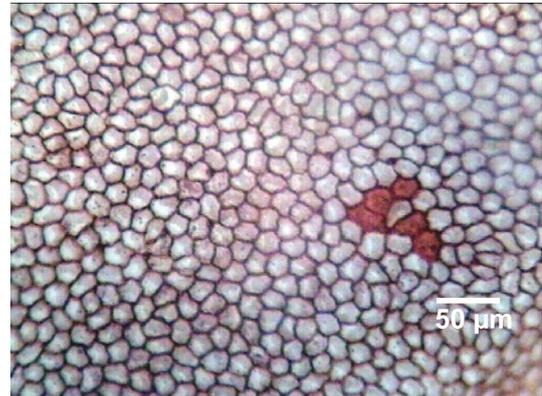
**Abbildung 3.6:** Cornea nach 7-tägiger Inkubatorlagerung



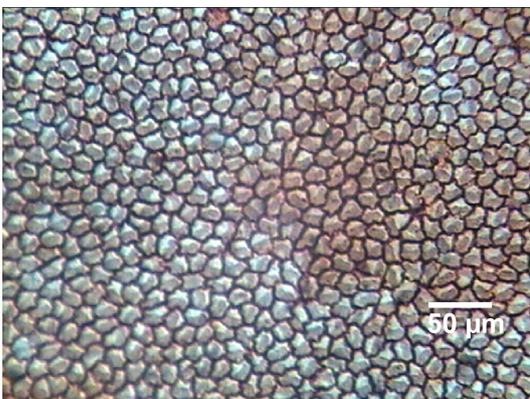
**Abbildung 3.7:** Cornea nach 14-tägiger Inkubatorlagerung



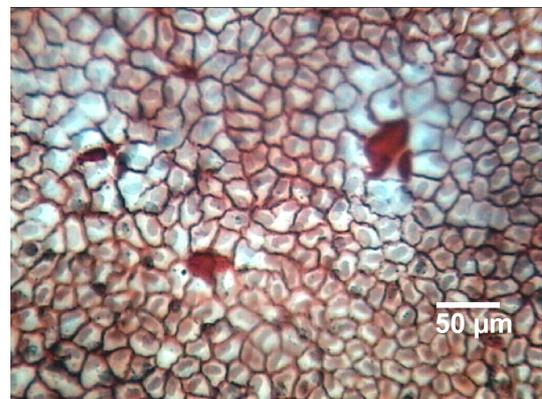
**Abbildung 3.8:** Cornea nach 7-tägiger Lagerung in Chen-Medium



**Abbildung 3.9:** Cornea nach 14-tägiger Lagerung in Chen-Medium



**Abbildung 3.10:** Cornea nach 7-tägiger Lagerung in Optisol



**Abbildung 3.11:** Cornea nach 14-tägiger Lagerung in Optisol

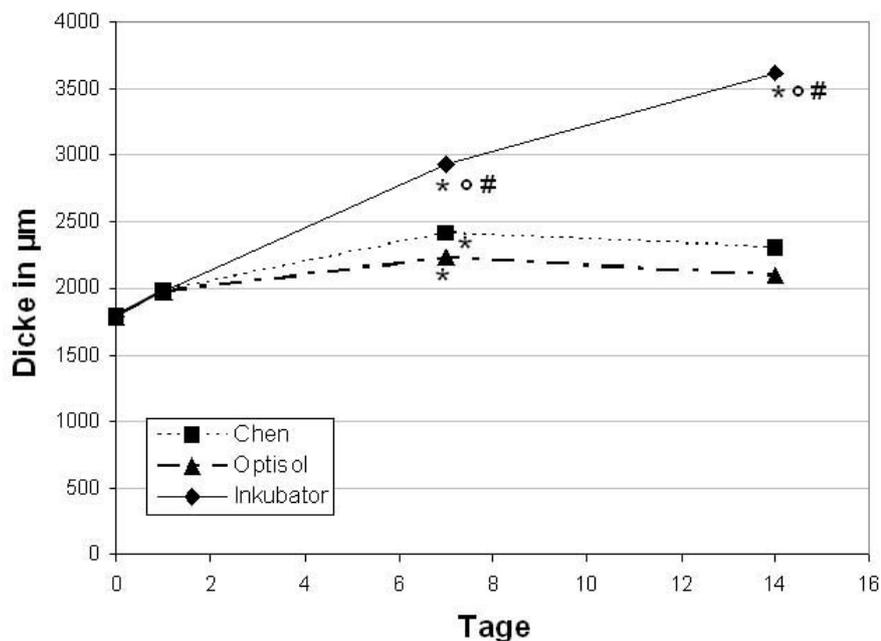
### 3.1.4 Corneadickenmessung

Die Dicke der Corneae nach 7 bzw. 14 Tagen jeweils gemessen nach einem zusätzlichen Tag in Entquellmedium im Inkubator war bei der Kontrollgruppe, welche nur diesen einen Tag im Entquellmedium verbrachte, im Mittel am niedrigsten (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.12). Die Differenz zu den anderen Gruppen war, mit Ausnahme der 14-tägigen Lagerung in Optisol und Chen-Medium, signifikant.

Innerhalb der Inkubatorlagerung nahm die Dicke proportional zur Lagerdauer signifikant zu, was nach 7 Tagen einer Zunahme von 64,8% nach 14 Tagen 103,4% gegenüber der Kontrollgruppe entsprach.

Bei der Lagerung in Optisol und Chen-Medium nahm die Dicke von der 7-tägigen zur 14-tägigen Lagerung geringfügig, jedoch nicht signifikant, ab.

Sowohl nach 7 Tagen, als auch nach 14 Tagen unterschied sich die Inkubatorlagerung signifikant von den beiden jeweils anderen Lagerungen.



**Abbildung 3.12:** Corneadicke, MW, Signifikanzen  $p < 0,05$  für: \* gegenüber 1 Tag Kontrolle,  $\circ$  gegenüber gleichlanger Lagerung in Optisol, # gegenüber gleichlanger Lagerung in Chen-Lösung; außerdem signifikanter Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen Inkubatorlagerung; SD vgl. Tabelle 3.1

Gruppen	Tg	intakte (Zellen/mm <sup>2</sup> )	defekte (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Dicke (μm)	intakte Bereiche (%)
<b>ohne Lagerung</b>	0	3871 ± 318 n = 33	111 ± 131 n = 33	1778 ± 325 n = 32	90,2 ± 8,4 n = 36
<b>Kontrollgruppe (Entquellmedium)</b>	1	3999 ± 376 n = 16	112 ± 108 n = 16	1977 ± 239 n = 15	89,3 ± 9,9 n = 16
<b>Organkulturlösung</b>	7	3731 ± 501 n = 12	114 ± 76 n = 12	2931 ± 488 n = 13	87,2 ± 6,8 n = 14
	14	3815 ± 875 n = 15	105 ± 68 n = 15	3616 ± 748 n = 15	78,7 ± 21,6 n = 17
<b>Chen-Lösung</b>	7	3869 ± 341 n = 18	107 ± 106 n = 18	2409 ± 222 n = 16	79,6 ± 15,7 n = 18
	14	3970 ± 327 n = 16	101 ± 139 n = 16	2298 ± 417 n = 14	82,5 ± 14,7 n = 16
<b>Optisol-Lösung</b>	7	4127 ± 319 n = 12	54 ± 68 n = 12	2226 ± 201 n = 12	69,5 ± 37,0 n = 15
	14	3506 ± 984 n = 6	104 ± 69 n = 6	2097 ± 460 n = 6	27,2 ± 35,0 n = 15

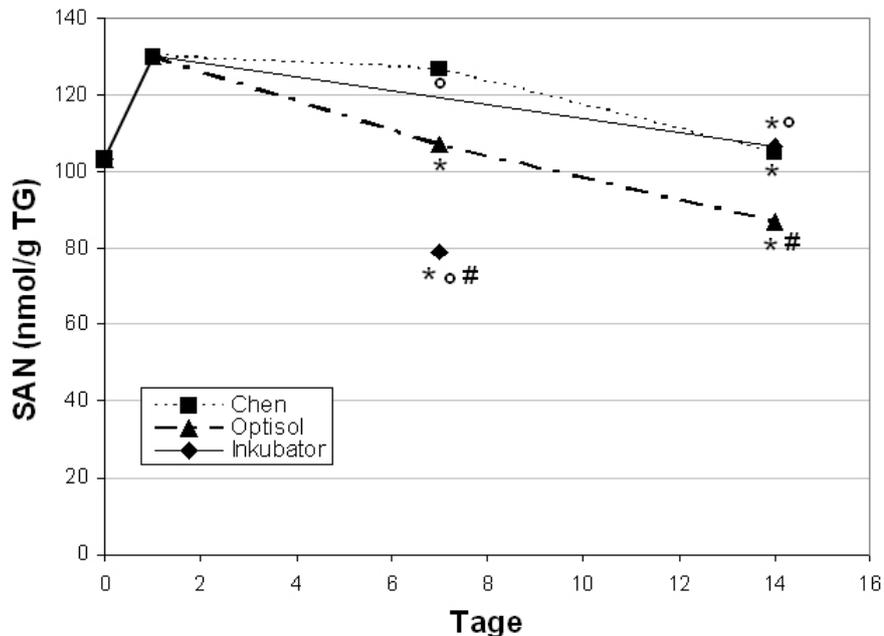
**Tabelle 3.1:** mikroskopische Auswertung, MW ± SD; Zellauszählung nur in den intakten Teilbereichen

Gruppen	Tg	ATP (nmol/g TG)	SAN (nmol/g TG)	ECP
<b>ohne Lagerung</b>	0	70,63 ± 22,49 n = 9	103,17 ± 27,51 n = 9	0,73 ± 0,05 n = 9
<b>Kontrollgruppe (Entquellmedium)</b>	1	87,83 ± 16,40 n = 10	130,16 ± 17,99 n = 10	0,79 ± 0,05 n = 10
<b>Organkulturlösung</b>	7	43,92 ± 6,88 n = 9	78,84 ± 12,63 n = 9	0,67 ± 0,04 n = 9
	14	59,52 ± 17,72 n = 14	106,61 ± 19,05 n = 14	0,74 ± 0,05 n = 14
<b>Chen-Lösung</b>	7	79,63 ± 14,55 n = 11	126,72 ± 19,05 n = 11	0,75 ± 0,07 n = 11
	14	69,84 ± 10,05 n = 10	105,03 ± 14,02 n = 10	0,79 ± 0,02 n = 10
<b>Optisol-Lösung</b>	7	64,02 ± 16,14 n = 10	107,14 ± 13,76 n = 10	0,75 ± 0,04 n = 10
	14	51,85 ± 10,32 n = 12	87,04 ± 15,61 n = 12	0,75 ± 0,02 n = 12

**Tabelle 3.2:** Stoffwechselzustand, MW ± SD

## 3.2 Adeninnukleotidmessung

### 3.2.1 Summe der Adeninnukleotide



**Abbildung 3.13:** Summe der Adeninnukleotide, MW, Signifikanzen  $p < 0,05$  für: \* gegenüber 1 Tag Kontrolle, o gegenüber gleichlanger Lagerung in Optisol, # gegenüber gleichlanger Lagerung in Chen-Lösung; außerdem signifikante Unterschiede jeweils zwischen 7 und 14 Tagen Chen-, Optisol- bzw. Inkubatorlagerung; SD vgl. Tabelle 3.2

Aus der Addition von ATP-, ADP- und AMP-Werten ergibt sich die Summe der Adeninnukleotide (SAN).

Die SAN-Werte waren im Mittel bei allen Gruppen niedriger als die der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.13).

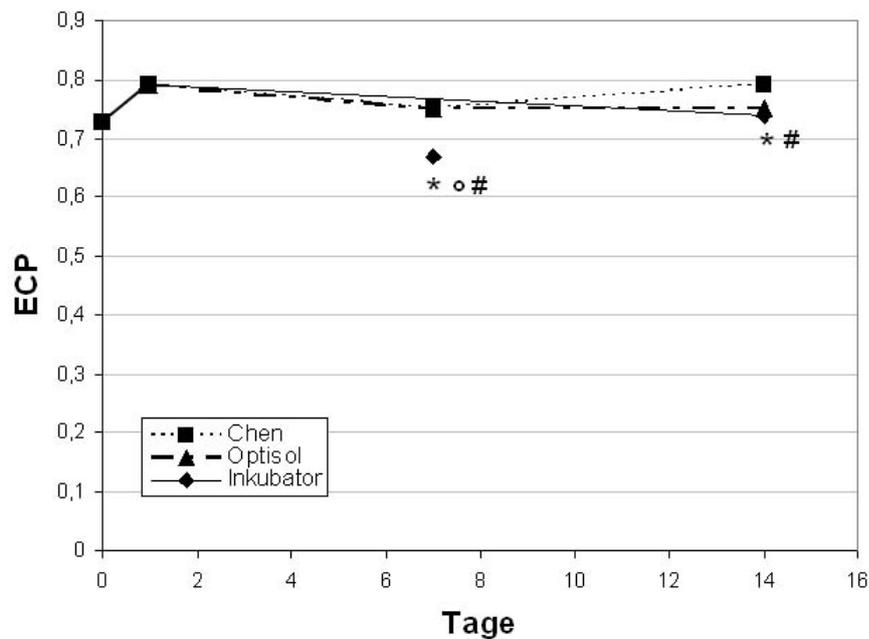
Während der Lagerung in Optisol oder Chen-Medium nahmen die Gesamtnukleotide im Mittel proportional zur Lagerungsdauer ab. Mit Ausnahme der 7-tägigen Chen-Lagerung war diese Abnahme gegenüber der Kontrollgruppe signifikant. Bei beiden Lagerungen waren die SAN-Werte der 14-tägigen Lagerungen signifikant niedriger als die der 7-tägigen Lagerung. Bei den Gesamtnukleotiden nach 14-tägiger Lagerung bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Lagerung in Optisol und den beiden jeweils anderen Lagerungen.

Die SAN-Werte fielen nach 7-tägiger Inkubatorlagerung besonders stark ab, waren aber nach 14-tägiger Lagerung im Mittel gleichstark abgefallen wie bei der 14 Tage Lagerung

in Chen-Medium. Der im Mittel starke Abfall der 7-tägigen gegenüber der 14-tägigen Inkubatorgruppe ist auf zusätzliche schädigende Faktoren in dieser weitgehend außerhalb der sonst strikt eingehaltenen Randomisierung nachgeholten Gruppe zurückzuführen (siehe Kapitel 4.3.1). Die 7-tägige Inkubatorgruppe ist somit als Ausreißer anzusehen und zu vernachlässigen.

Die SAN-Werte der Lagerungen im Inkubator und im Chen-Medium fallen somit über die Zeit gleichstark ab, die der Lagerung in Optisol fallen insgesamt stärker gegenüber den anderen beiden Lagerungen ab.

### 3.2.2 Energy Charge Potential



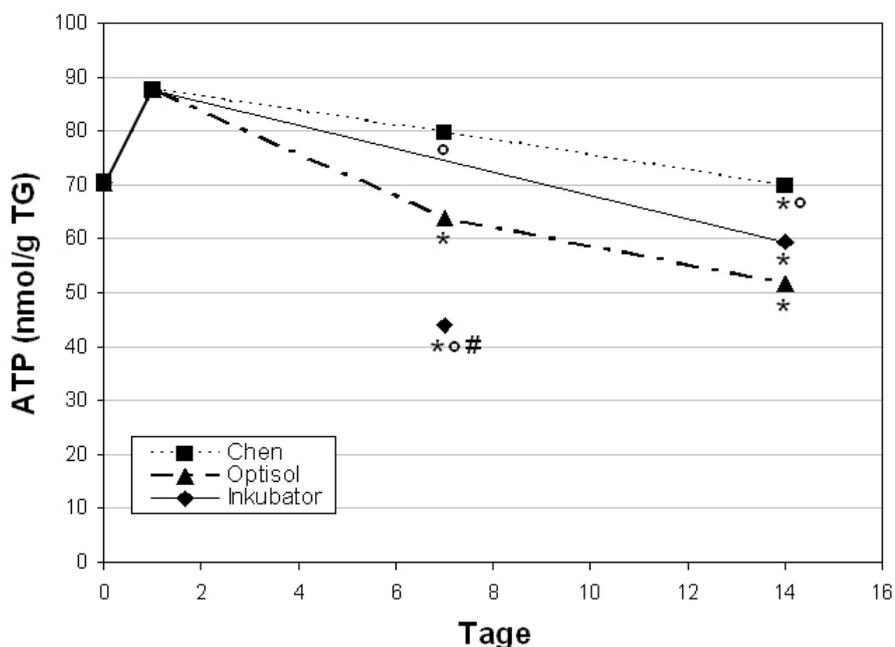
**Abbildung 3.14:** Energy Charge Potential, MW, Signifikanzen  $p < 0,05$  für: \* gegenüber 1 Tag Kontrolle,  $\circ$  gegenüber gleichlanger Lagerung in Optisol, # gegenüber gleichlanger Lagerung in Chen-Lösung; außerdem signifikanter Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen Inkubatorlagerung; SD vgl. Tabelle 3.2

Das Energy Charge Potential (ECP) ergibt sich aus der Summe der ATP- und der Hälfte der ADP-Gehalte im Verhältnis zu den Gesamtnukleotiden.

Die ECP-Werte waren nach 7- bzw. 14-tägiger Lagerung plus 1-tägiger Entquellung im Inkubator weitgehend unverändert gegenüber der Kontrollgruppe mit Ausnahme der 7-tägigen Inkubatorlagerung (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.14).

Das ECP der 7-tägigen Inkubatorlagerung unterschied sich signifikant von der 7-tägigen Lagerung in Optisol und Chen-Medium, was jedoch wie bereits beschrieben wohl auf eine zusätzliche Schädigung zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.2.1). Bei der 14-tägigen Lagerung unterschieden sich nur Inkubator- und Chengruppe signifikant.

### 3.2.3 ATP-Gehalt



**Abbildung 3.15:** Gehalt an ATP, MW, Signifikanzen  $p < 0,05$  für: \* gegenüber 1 Tag Kontrolle, ° gegenüber gleichlanger Lagerung in Optisol, # gegenüber gleichlanger Lagerung in Chen-Lösung; außerdem signifikanter Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen Inkubatorlagerung; SD vgl. Tabelle 3.2

Der Gehalt an ATP war im Mittel bei allen Gruppen niedriger als in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.15). Die Differenz war, mit Ausnahme der 7-tägigen Lagerung in Chen-Medium, signifikant. Die nach 7 Tagen ermittelten ATP-Werte aller Lagerungen unterschieden sich signifikant. Gleiches galt für die 14-tägige Lagerung in Chen-Medium und in Optisol.

Der mittlere ATP-Wert war, genauso wie der mittlere SAN-Wert, nach 7-tägiger Inkubatorlagerung besonders stark abgefallen und kann zum Vergleich mit den übrigen Gruppen nicht herangezogen werden (siehe Kapitel 3.2.1). In der 14-Tage Gruppe lag die Inkubatorlagerung aber im Mittel zwischen der Chen- und der Optisolgruppe.

Der Abfall des ATP gegenüber der Kontrollgruppe war also bei der Lagerung in Optisol am stärksten, am geringsten war er bei der Chen-Gruppe.



# 4 Diskussion

## 4.1 Tiermodell

Corneae von Schweinen, Kaninchen und Katzen wurden weltweit bereits von zahlreichen Autoren zur Erarbeitung und Überprüfung von Konservierungsmedien und -verfahren eingesetzt. Das Schwein bietet dabei den Vorteil, dass die Corneae als „Abfallprodukte“ am Schlachthof anfallen und so mit sehr geringem Aufwand und ohne den Einsatz von Versuchstieren beschafft werden können. Außerdem bestehen so gleiche Voraussetzungen bezüglich der Post-Mortem-Zeit und der Zeit nach Gewebenentnahme.

## 4.2 Methode

### 4.2.1 Transport und Aufbereitung

Beim Transport wurde zur Erhaltung des Corneaepithels körperwarme, begaste Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Krebs-Henseleit-Lösung ist eine isotone Elektrolytlösung mit einem Natriumbikarbonat-Puffer. Durch Begasung mit Carbogen (95% Sauerstoff + 5% Kohlendioxid) lässt sich der pH-Wert konstant auf 7,4 halten.

1988 beschrieben Müller et al. eine Abhängigkeit der metabolischen Parameter von der Zeit nach Eukleation. In einer experimentellen Studie an Schweinecorneae verglichen sie den ATP-, ADP-, Glukose- und Glykogengehalt des Epithels, sowie den Glukose-, Laktat- und Pyruvatgehalt in Stroma und Medium von ungelagerten und bis zu 30 Tage bei 21°C gelagerten Corneae. Der stromale Glukosegehalt halbierte sich innerhalb der ersten 3 Stunden nach Eukleation (2  $\mu\text{mol/g}$  Feuchtgewicht 45 Minuten nach Eukleation; 1  $\mu\text{mol/g}$  Feuchtgewicht 3 Stunden nach Eukleation). Dies wurde auf den Glukoseverbrauch des Stromas und des Epithels während der Ischämie zurückgeführt. Der stromale Laktatgehalt verhielt sich gegenläufig (4,3  $\mu\text{mol/g}$  nach 45 Minuten; 7,3  $\mu\text{mol/g}$  nach 3 Stunden) [Müller 1988].

In unseren Untersuchungen wurde die Zeit von 3 Stunden von Eukleation bis Lagerung

nicht überschritten, um eine so bedingte Beeinflussung des metabolischen Stoffwechsels zu verhindern.

Die Desinfektion der Bulbi erfolgte mit Polyvinylpyrrolidon-Iodine (PVP-I), welches anschließend mit Na-Thiosulfat neutralisiert wurde. PVP-I ist ein wasserlöslicher Komplex mit 10% Jod, das über Wasserstoffbrücken gebunden ist. Die günstigen mikrobiziden Eigenschaften des Jods bleiben so erhalten und der gewebsschädigende Effekt wird eliminiert. PVP-I weist nur eine geringe Zelltoxizität auf und ist wirksam gegen viele Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren [Hagenah 1995].

Thiosulfat reagiert mit Jod und führt so zu einer Entfärbung des mit PVP-I Lösung behandelten Gewebes. Bei diesem Desinfektionsverfahren handelt es sich um ein bewährtes Verfahren zur Keimreduktion. Eine vollständige Keimfreiheit lässt sich jedoch nicht erzielen, so dass weitere Maßnahmen notwendig sind. Dazu gehören die Sterilisation sämtlicher Gefäße und Bestecke und der Einsatz von Antibiotika und Antimykotika in den Lagerungsmedien (siehe Kapitel 4.3.1).

## **4.2.2 Färbung**

Laut Meltendorf et al. stellt das Schwellen der Interzellularräume mit hypotonen Lösungen als Alternative zu Vitalfärbung das Mittel der Wahl in der Organkultur dar. Der dadurch auf das Corneaendothel ausgeübte osmotische Stress könnte jedoch zu weiterem Zellverlust führen [Meltendorf 2007]. Mit dieser Methode ist nur die Beurteilung von Zellgröße, -form und -zahl möglich.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die kombinierte Färbung mit Alizarin-rot S und Trypanblau durchgeführt. Neben der Beurteilung der Zellgröße, -form und -zahl ist hierbei eine Vitalitätsbeurteilung der Endothelzellen durch Trypanblau und eine Darstellung defekter Zellen mit Alizarin-rot S möglich. Auch eine vollständige Endothelzellablösung von der Descemet'schen Membran durch die Alizarin-rot-Färbung ist deutlich darstellbar.

Alizarin-rot S ist ein Anthrachinonfarbstoff zur Sichtbarmachung der Zellgrenzen, der außerdem die Descemetsche Membran diffus rot färbt. Wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, wie es beim Zugrunde gehen der Zelle der Fall ist, so kann Alizarin-rot S auch in die Zelle eindringen und führt so zu einer Rotfärbung des Zytoplasmas defekter Zellen. Aufgrund seiner Toxizität muss die Anwendung von Alizarin-rot S auf experimentelle Zwecke beschränkt bleiben. In der Praxis sind die Phasen-Kontrast-Mikroskopie und die Spektralmikroskopie weit verbreitet. Diese Methoden erlauben jedoch lediglich die

Beurteilung der Zellform und -anzahl, Angaben über die Vitalität der Zellen sind so nicht möglich.

Taylor und Hunt erhielten die besten Färbeergebnisse mit einem pH-Wert von 4,2, welcher in dieser Arbeit übernommen wurde [Taylor/Hunt 1981].

Trypanblau ist ein Azofarbstoff zur Vitalitätsbeurteilung der Endothelzellen. Ist die Zellpermeabilität einer Zelle erhöht, so ist Trypanblau in der Lage in die Zelle einzudringen und färbt den Zellkern blau [Spence/Peyman 1976].

In einer Untersuchung zur Vitalfärbung von Corneaendothel von Singh et al. 1985/86 wurden Trypanblau und Alizarin-rot S verglichen und kombiniert. Sie erhielten die besten Färbeergebnisse nach 1-minütiger Trypanblaufärbung gefolgt von  $\frac{1}{2}$ -1-minütiger Alizarin-rot S-Färbung [Singh 1985/86]. Auch andere Autoren verwendeten diese Methode erfolgreich [Taylor/Hunt 1981, Spence/Peyman 1976].

Die von Singh et al. beschriebene Färbemethode war in dieser Arbeit nicht nachvollziehbar. Nach vorrangegangener Trypanblaufärbung wurde der Alizarinrotfarbstoff nicht mehr vom Gewebe angenommen und führte zu keinem zufriedenstellenden Färbeergebnis. Die umgekehrte Reihenfolge, wie sie von Sperling et al. beschrieben wurde, war schließlich erfolgreich und wurde in dieser Arbeit übernommen [Sperling 1976]. Es ist zu bemerken, dass die Trypanblaufärbung insgesamt nicht sehr deutlich ausgefallen ist und keine entscheidenden Erkenntnisse daraus gewonnen werden konnten. Sie wurde trotzdem routinemäßig weiterhin durchgeführt.

### 4.2.3 HPLC

Die HPLC ermöglicht die Bestimmung der Adeninnukleotide. Es handelt sich bei unseren Versuchen um eine Umkehr-Phase Chromatographie, d.h. die Polarität der mobilen Phase (Laufmittel) ist größer als die Polarität der stationären Phase (Säule). Die stationäre Phase besteht aus einem sphärischen, porösen Kieselgel (LiCrospher®100 RP-18) mit unpolaren Kohlenwasserstoffketten, die mit den unpolaren Teilen der Probenmoleküle im Laufmittel interagieren. Die im Laufmittel enthaltene 11-Aminoundekansäure beschichtet die Säule, verlängert so die Kohlenwasserstoffketten, und führt zu einer Verstärkung der Wechselwirkungen mit den Probenmolekülen. Dieser Effekt wird durch den pH-Wert von 6,4 zusätzlich unterstützt und führt zu einer besseren Peakdifferenzierung [Fischer 1995]. Je höher der Phosphorylierungsgrad des Substrates, desto länger ist die Haftung an der Säule. Es kommt zu einer Umkehr der Adeninnukleotide, wodurch ATP sich als letztes von der Säule löst.

ATP dient als zelluläre Energiequelle, da es sich bei den Phosphatbindungen um sehr

energiereiche Bindung handelt und diese durch hydrolytische Abspaltung der Phosphatreste freigesetzt wird. ATP ist die einzige Energiequelle der Cornea. Im Gegensatz zu Gehirn und Muskulatur kann die Cornea Creatinphosphat nicht zur Energiebereitstellung nutzen. Die Phosphatgruppe des Creatinphosphats wird in diesen Geweben mithilfe der Creatinkinase auf ADP übertragen und so ATP schnell synthetisiert. In der Cornea wird ATP ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung bei ausreichendem Sauerstoff- und Substratangebot aus ADP synthetisiert.

Der Adeninnukleotidgehalt von Geweben ist der meist genutzte Parameter zur Beschreibung des Energiestoffwechsels von Zellen [Fischer 1995].

ATP stellt die aktuell verfügbare Energie der Zelle dar. Der ATP-Gehalt fällt bei Sauerstoff- oder Substratmangel aufgrund der fehlenden ATP-Synthese ab.

Die Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte ergibt die Menge der gesamten Adeninnukleotide (SAN). SAN beschreibt die Erholungsfähigkeit der Zelle bei günstiger Energieproduktion, d.h. bei ausreichendem Sauerstoff- und Substratangebot [Atkinson 1968], da eine Rephosphorylierung unter diesen Umständen sowohl von AMP wie von ADP zu ATP leicht möglich ist. Aus weiteren Abbaustufen wie Adenosin, Inosin, IMP, Hypoxanthin oder Xanthin ist ein Wiederaufbau jedoch nur über Neusynthese möglich, die zeitaufwändiger ist und in Abhängigkeit von der Abbaustufe zunehmend schwieriger wird. Sind die SAN-Werte hoch, so ist die Wiederauffüllung von Energiereserven in Form von ATP möglich.

Mithilfe der SAN läßt sich das „energy charge potential“ (ECP) als Maß für den Phosphorylierungsgrad der Adeninnukleotide rechnerisch ermitteln [Atkinson 1968]. Das ECP stellt das Verhältnis von ATP-Synthese und Verbrauch dar und beschreibt so die akute Energielage der Endothelzellen. Werte zwischen 0,8 und 0,9 beschreiben eine gute Energielage. Ein Abfall z.B. durch Sauerstoffmangel vollzieht sich innerhalb weniger Minuten, kann aber im Rahmen einer Reoxygenierung auch innerhalb weniger Minuten vollständig rückgängig gemacht werden.

### **4.3 Konservierungsmedien**

Medium 199 ist Bestandteil des Chen- und Organkulturmediums und enthält Hepes-Puffer.

Diesem Basismedium wurde Phenolrot, ein Triphenylmethanfarbstoff, zugesetzt, das als pH-Indikator mit einem Umschlagsbereich zwischen pH 6,4 und 8,2 diente. Rot kennzeichnet den alkalischen, gelb den sauren Bereich. Üblicher Weise kommt es in der Or-

gankultur mit zunehmender Lagerdauer zu einer geringen Farbverschiebung des Mediums in den sauren Bereich, da Nährstoffe aufbraucht werden und Laktat produziert wird. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf einen guten Stoffwechselzustand der Corneae, was durch eine regelmäßige Erneuerung des Lagerungsmediums zur Korrektur der Farbverschiebung verhindert würde. In der klinischen Praxis wird ein Mediumwechsel nur nach 28-tägiger Lagerung oder vor Transplantation zur Entquellung durchgeführt [Redbrake-Adams 1999]. Somit haben wir auf einen Mediumwechsel während der Lagerungsdauer verzichtet. Phenolrot dient neben der pH-Indikation auch der Kontaminationsdetektion. Bei einer bakteriellen oder fungalen Kontamination des Mediums, kommt es zu einem erhöhten Nährstoffverbrauch durch die Mikroorganismen oder Pilze, der durch einen schnellen Farbumschlag des Mediums sichtbar wird. Ein zusätzlicher Hinweis für eine Kontamination ist eine Mediumtrübung. Diese Veränderungen wurden mikroskopisch kontrolliert und der Nachweis von Mikroorganismen oder Pilzen führte zum Ausschluss der betroffenen Cornea.

#### **4.3.1 Antibiotika und Antimykotika**

Der Bulbus und die Cornea sind physiologischer Weise mit Mikroorganismen besiedelt. Eine Desinfektion der Bulbi vor Präparation der Cornea und auch die Sterilisation sämtlicher Transportgefäße und der Bestecke reduziert diese Mikroflora, führt jedoch nicht zu einer vollständigen Elimination. Deshalb wurden den Lagerungsmedien Antibiotika und Antimykotika zugesetzt. In diesem Fall wurden zunächst Penicillin (v.a. gram-positive Wirkung), Streptomycin (v.a. gram-negative Wirkung) und Nystatin, die gebräuchlichsten Substanzen, verwendet. Es besteht jedoch immer die Gefahr von Kontaminationen durch Keime, die gegen die verwendeten Antibiotika resistent sind.

Nach gehäuftem Auftreten von Kontaminationen der in Organkultur gelagerten Corneae (Inkubator 7 Tage: 52, 8%; Inkubator 14 Tage: 39, 6%), trotz durchgeführter Desinfektionsmaßnahmen von Inkubator und Besteck nach jeder Benutzung, wurden einige der betroffenen Proben in einem Speziallabor mikrobiologisch untersucht und anschließend eine Resistenzuntersuchung durchgeführt. Es wurde *Escherichia coli* in Reinkultur nachgewiesen. Die Resistenzuntersuchung ergab eine Sensitivität gegenüber Gentamycin (v.a. gram-negative Wirkung). Dieses wurde von diesem Zeitpunkt an der Organkulturlösung zugefügt mit dem Erfolg, dass die Häufigkeit der Kontaminationen drastisch reduziert wurde (Inkubator 7 Tage: 8, 7%; Inkubator 14 Tage: 9, 1%). Die kontaminationsbedingt verworfenen Corneae wurden zu einem späteren Zeitpunkt geschlossen nachgeholt. Aufgrund des besonders hohen Verlusts von Corneae der 7-tägigen Inkubatorlagerung führte dies in

dieser Gruppe zu einer teilweisen Aufhebung der Randomisierung mit Auswirkung auf die im folgenden diskutierten Stoffwechselergebnisse (siehe Kapitel 4.4.1).

Aus dem zuvor Beschriebenen ist ersichtlich, dass eine vollständige Verhinderung von Kontaminationen nicht möglich ist. Durch einen hohen Standard der Sterilität von Instrumenten und Technik, lässt sich jedoch der Verlust der in Organkultur gelagerten Corneae durch Kontamination gering halten.

Die Möglichkeit der Aufdeckung von bakteriellen und fungalen Kontamination ist als Vorteil der Inkubatorlagerung in Organkulturlösung zu werten [Armitage/Easty 1997], da sie zur Verhinderung der Transplantation von kontaminierten Corneae beiträgt. Virusinfektionen werden durch Zugabe von Antibiotika und -mykotika nicht beeinflusst, können jedoch in der Organkultur zum Ausbruch kommen. Die Inkubatorlagerung kann somit als Stresstest angesehen werden [Pels 2007]. Bei der hypothermen Lagerung ist die Erkennung von Kontaminationen aufgrund der Reduktion der Stoffwechselaktivität der Cornea und der Mikroorganismen nicht möglich, erfolgt jedoch im Rahmen der anschließenden Entquellung im Inkubator für einen Tag.

Die rechtzeitige Erkennung von Kontaminationen ist im Hinblick auf die Endophthalmitisgefahr nach Corneatransplantation von besonderer Wichtigkeit. Nach Recherche von Kapur et al. ist die Endophthalmitisinzidenz nach penetrierender Keratoplastik mit 0,08-0,77% größer als nach Katarakt-OP (0,04-0,07%). Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Transplantatkontamination und Entwicklung einer Endophthalmitis besteht. Aufgrund der sehr schlechten Prognose nach Endophthalmitis ist diese geringe Inzidenz jedoch bereits von klinischer Bedeutung [Kapur 2006].

In einer fallvergleichenden Studie beurteilten Hassan et al. 2005 die Risikofaktoren von fungaler gegenüber bakterieller Endophthalmitis. Sie kamen zu dem Schluss, dass es sich bei 55,6% der gemeldeten Endophthalmitiden um eine bakterielle Ursache handelte. Nur 19,7% waren fungalen Ursprungs. Die Skleraring- und die Empfängerkultur stimmten in 27,5% der bakteriellen und in 67,9% der fungalen Endophthalmitiden überein. Sie berichteten außerdem, dass postkeratoplastisch die Häufigkeit von bakterieller Endophthalmitis gegenüber fungaler Endophthalmitis in ihren Untersuchungen sank, was sie teilweise der Verwendung von Gentamycin und Streptomycin zuschrieben. In dieser Arbeit wurde Nystatin zur Vorbeugung fungaler Kontaminationen sowohl den Organkulturmедien als auch dem Chen-Medium zugesetzt. Optisol-GS enthält keine Antimykotika [Hassan/Wilhelmus 2005].

Ritterband et al. beschrieben, dass eine Zugabe von Voriconazol (Azol-Antimykotikum) zu Optisol-GS zu einer signifikanten Reduzierung der fungalen Kontaminationen führt. Sie beobachteten keine Anzeichen von Endothelzytotoxizität [Ritterband 2007]. Da es

sich bei Optisol-GS um eine patentierte Originallösung handelt, erfolgten in unseren Versuchen keine Ergänzungen diesbezüglich.

Generell ist die Gefahr der Kontamination bei der hypothermen Lagerung bei 4°C aufgrund der geringeren Wirksamkeit der Antibiotika bei diesen Temperaturen erhöht. 12-28% der verbliebenen Skleralringe transplantierte Corneae waren laut einer klinischen Studie von Farrell kulturpositiv [Farrell 1991]. Kapur et al. beschrieben eine deutliche Wirksamkeitssteigerung der Antibiotika bei einer an die hypotherme Lagerung angeschlossenen Lagerung bei Raumtemperatur vor der Corneatransplantation. Die optimale Dauer dieser Raumtemperaturlagerung bedarf weiterer Studien [Kapur 2006]. In unserer Arbeit wurden die Corneae unter anderem deshalb im Anschluss an die hypotherme Lagerung 24 Stunden bei 34°C in Entquellmedium im Inkubator gelagert.

### 4.3.2 FCS

FCS wird aus Blut von bei der Schlachtung anfallenden bovinen Feten gewonnen. Es handelt sich um ein in der Organkultur weitverbreitetes Zusatz und wurde somit in unseren Versuchen der Organkulturlösung zugefügt. Die genaue Funktion des FCS wird in der Literatur nur sehr spärlich beschrieben. Es enthält Wachstumsfaktoren und soll das Endothel vor Endotoxinen schützen [Sobottka Ventura 1999]. Gleichzeitig birgt FCS aufgrund seiner Herkunft Gesundheitsgefahren. Dies sind im Einzelnen Prionen- und Viruskontaminationen mit zoonotischem Potential (z.B. BSE), bakterielle Kontamination, sowie bakterielle Endotoxine. Da es sich um ein Naturprodukt handelt, variiert die Zusammensetzung des Serums und damit die Mediumzusammensetzung.

Aufgrund dieser Probleme gibt es neuere Studien, die die Wirkung von serumfreien Medien untersuchen. So fanden Thuret et al. 2005 in einer experimentellen Studie nach 30 Tagen serumfreier Lagerung in ACF-Medium 18% mehr Endothelzellen als nach gleich langer Lagerung in Medium mit 2% FCS. Die Zusammensetzung von ACF-Medium war nicht genau bekannt, da es sich um eine patentierte Lösung handelte. Es enthielt ausdrücklich weder tierische oder menschliche Bestandteile noch Wachstumsfaktoren. Eine klinische Multicenter-Studie zum Vergleich von ACF-Medium und Medium mit FCS sollte 2004 in Frankreich beginnen [Thuret 2005]. Ergebnisse dazu sind bis jetzt nicht veröffentlicht.

Reim et al. untersuchten den Einfluß von Serum auf den Stoffwechsel von Schweinecorneae [Reim 2001]. Dabei verglichen sie ein Kulturmedium, dem 10% frisches Schweineserum zugesetzt wurde, mit einem epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) enthaltenen Medium. Sie beschrieben signifikant höhere ATP-Gehalte im Epithelium (10% Serum:

4,9  $\mu\text{mol/g}$  TG; EGF: 6,9  $\mu\text{mol/g}$  TG) und einen signifikant höheren ATP/ADP-Quotienten nach 6-tägiger Lagerung bei 31°C im EGF-Medium. Ob es sich bei diesem Wachstumsfaktor um einen humanen, animalen oder synthetischen Bestandteil handelt, wird nicht näher erläutert. Jedoch wird auf eine Arbeit von Lass et al. verwiesen [Lass 1994], in der ein humaner EGF zum Einsatz kommt, womit das Gesundheitsgefahrenpotential weiterhin bestünde.

In einer experimentellen Studie untersuchten Bednarz et al. die Auswirkung von F99, MEM und Endothelial-SFM (patentierte Lösung, ohne Wachstumsfaktoren, ohne tierische bzw. menschliche Bestandteile) mit 0-5% FCS-Supplementierung auf isolierte Endothelzellen und auf Corneakulturen [Bednarz 2001]. Endothelial-SFM (mit und ohne FCS) zeigte dabei mit 6% die wenigsten Trypanblau-gefärbten Endothelzellen nach 3-wöchiger Lagerung und wies außerdem signifikant kleinere nekrotische Bereiche gegenüber MEM auf. Bednarz et al. schlossen daraus, dass Endothelial-SFM keiner Serumsupplementierung bedürfe.

Weder ACF-Medium noch Endothelial-SFM finden bisher Anwendung in der Klinik, weshalb unserem Organkulturmedium FCS zugesetzt wurde.

### **4.3.3 HES**

Hydroxyethylstärke (HES) wird aus Wachsmaisstärke hergestellt und besteht zu 95% aus Amylopektin, also aus verzweigten Glukosemolekülketten. Diese Glukosemoleküle sind z.T. durch Wasserstoffmoleküle hydroxyethyliert, was den Abbau von HES verlangsamt. Der Substitutionsgrad 0,5 bedeutet, dass die Hälfte der Glukosemoleküle hydroxyethyliert ist. Aufgrund dieser Molekülverzweigung weist HES eine hohe Wasserbindungskapazität auf. Durch die Anreicherung des Mediums mit HES entsteht eine hypertone Lösung und somit ein kolloidosmotisches Gefälle zwischen der intrazellulären Matrix und dem Medium. Dies hat einen Flüssigkeitsentzug der Zellen zur Folge. Somit wird ein Aufquellen der Cornea verhindert bzw. minimiert.

HES kann durch humane  $\alpha$ -Amylase gespalten werden.  $\alpha$ -Amylase ist ebenfalls in FCS enthalten und führt dann zu einem Abbau von HES und somit zu einer Überzuckerung des Mediums und einem Verlust der osmotischen Funktion [Redbrake 2006, Hagenah 1996]. Somit können HES und FCS nicht in Kombination eingesetzt werden, weshalb das hier verwendete Langzeitmedium kein HES enthielt.

HES wird ebenso wie Dextran von den Endothelzellen und den Keratozyten der Cornea aufgenommen [van der Want 1983], jedoch ist die Zahl der anaphylaktoiden Reaktionen nach HES deutlich geringer als nach Dextran [Hagenah 1996].

In einer experimentellen Studie von Reim et al. wurde der Einfluß von unterschiedlichen Dextrankonzentrationen auf die Hydratation und den Energiestoffwechsel von Schweinecorneae untersucht. Wurden mit 7,5% und 10% Dextran im Kulturmedium niedrigere Wassergehalte als physiologisch vorgefunden, so sank der ATP-Gehalt im Corneaepithel bei diesen Konzentrationen auf 22% bzw. 11% der Ausgangswerte ab [Reim 2001]. Aufgrund dieser gravierenden Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der Cornea wurde in dieser Arbeit HES verwendet. Somit ist Dextran nur in Optisol-GS Medium enthalten, da dies aufgrund der Patentierung gebrauchsfertig bezogen wurde.

#### 4.3.4 Chen-Medium

Chen-Medium ist ein isotones (~305 mOsm) Medium auf der Basis von Medium 199 zur hypothermen Cornealagerung, welches mit  $\beta$ -Hydroxybutyrat angereichert wird.  $\beta$ -Hydroxybutyrat ist ein Ketonkörper, der physiologischer Weise bei unzureichendem Glukoseangebot in den Mitochondrien der Leber synthetisiert wird und extrahepatisch im Herzmuskel und in der Skelettmuskulatur als Substrat für die ATP-Synthese dient. In der Organkultur wird  $\beta$ -Hydroxybutyrat zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels, also als Substrat für die ATP-Synthese, bei der hypothermen Lagerung mit Chen-Medium erfolgreich eingesetzt [Chen 1999]. Der Vorteil gegenüber Glukose besteht darin, dass keine Laktatbildung und -anreicherung, wie bei der anaeroben Glykolyse, stattfindet [Chen 1990]. Somit wird eine laktatbedingte Senkung des intrazellulären pH-Werts verhindert und gleichzeitig die Glykolyse gehemmt [Chen 1994].

Außerdem fällt bei der Oxidation von  $\beta$ -Hydroxybutyrat Kohlendioxid an, was als endotheleigene Bikarbonatquelle dient [Chen 1994]. Deshalb bedarf es keiner Zugabe von Natriumbikarbonat zum Chen-Medium, welches zu unerwünschten pH-Wert Verschiebungen in den basischen Bereich führt, falls kein Puffer mit ausreichend hoher Kapazität anwesend ist [Chen 1997].  $\beta$ -Hydroxybutyrat hat somit in zweierlei Hinsicht eine pH-Wert stabilisierende Funktion.

Aufgrund der so aufrechterhaltenen Stoffwechselfunktionen (Endothelpumpe u.a.) kommt es laut Chen et al. zu keiner Schwellung des Endothels und keine Zusatz von hypertonen Substanzen sei nötig [Chen 1999](siehe Kapitel 4.4.3).

Aufgrund der beschriebenen Nachteile von Dextran, wurde dieses durch HES ersetzt (siehe Kapitel 4.4.3).

Verschiedene Autoren haben seit der Entwicklung des Chen-Mediums dieses mit dem in den USA hauptsächlich verwendeten Optisol-GS verglichen.

So untersuchten Yap et al. in einer experimentellen Studie die corneale Endothelzellfunktion durch Dickenmessung humaner Corneae nach 2-tägiger Lagerung in Chen-Medium

oder Optisol-GS bei 4°C während der anschließenden 12-stündigen Lagerung bei 37°C [Yap 2001]. Während der Aufwärmperiode von 12 Stunden konnten sie keine Unterschiede in der Corneadickenentwicklung der beiden Versuchsgruppen feststellen. Die Dicke der Corneae beider Gruppen nahm von Beginn (Chen: 628,7  $\mu\text{m}$ ; Optisol: 617,6  $\mu\text{m}$ ) bis zur vierten Stunde der Aufwärmphase ab (Chen: 539,6  $\mu\text{m}$ ; Optisol: 546,0  $\mu\text{m}$ ) und stieg dann bis zur zwölften Stunde über die Ursprungsdicke an (Chen: 644,2  $\mu\text{m}$ ; Optisol: 652,1  $\mu\text{m}$ ). Die endotheliale Pumpfunktion der in Chen-Medium gelagerten Corneae wurde in Untersuchungen von Yap et al. genauso gut erhalten, wie die der in Optisol-GS gelagerten Corneae. Eine elektronenmikroskopische Auswertung der Corneae ergab jedoch eine größere Endothelablösung der in Optisol-GS gelagerten Corneae gegenüber der in Chen-Medium gelagerten [Yap 2001].

In einer anderen experimentellen Studie wurde der Einfluß dieser beiden Medien auf das Schwellungsverhalten, die Endothelzellstruktur und das Apoptoseverhalten untersucht [Nelson 2000]. Humane, in Chen-Medium gelagerte Corneae waren signifikant dicker als die gepaarten, in Optisol-GS gelagerten Corneae nach 0, 7, 10, 14 und 21 Tagen. Sie beschrieben eine massive Dickenzunahme der in Chen-Medium gelagerten Cornea von der ersten zur zweiten Lagerungswoche und führten dies auf eine Änderung der zellulären Barrierefunktion von Endo- und Epithel zurück. Dies führe zu einem Wassereinstrom in das Stroma, welcher aufgrund der geringen metabolischen Pumpleistung bei 4°C nicht reguliert werden könne [Nelson 2000]. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu der bereits oben beschriebenen von Chen et al. vertretenen Theorie der aufrechterhaltenen Stoffwechselfunktionen. Bezüglich des Endothelzellverlusts während der Lagerung und des Apoptoseverhaltens unterschieden sich die beiden Medien in dieser invitro Studie nicht, was zu der Aufnahme des Chen-Mediums als Medium für humane Corneakonservierung an der Mayo Clinic Eye Bank (Rochester, MN, USA) führte [Bourne 2001]. In einer klinischen Studie verglichen Bourne et al. die Entwicklung innerhalb des ersten postkeratoplastischen Jahres der ersten 15 Patienten, die in Chen-Medium gelagerte Corneatransplantate erhielten mit der von Empfängern von in Optisol-GS gelagerten Transplantaten [Bourne 2001]. Es wurden die Endothelzellichte und die Corneadicke beurteilt. Nach einem Jahr konnten keine signifikanten Unterschiede in der Dickenzunahme der Corneae festgestellt werden (Chen-Medium:  $0,53 \pm 0,05$  mm; Optisol-GS:  $0,57 \pm 0,06$  mm), gleiches galt für den Endothelzellverlust (Chen-Medium:  $19 \pm 22\%$ ; Optisol-GS:  $17 \pm 7\%$ ).

### **4.3.5 Optisol-GS**

Optisol basiert auf einer Kombination aus MEM und Medium 199 und enthält unter anderem Natriumbikarbonat, Dextran und Chondroitinsulfat [Chen 1999]. Durch Zugabe von

Streptomycinsulfat erfolgte eine Modifizierung zu Optisol-GS.

Chondroitinsulfat ist ein sulfatiertes Glycosaminoglykan mit einem Molekulargewicht von 25000 bis 80000 Dalton. Aufgrund seiner Struktur besitzt es eine hohe Wasserbindungskapazität.

Bei Dextran handelt es sich um ein hochmolekulares Polysaccharid auf der Basis von Glucose-Monomeren, das als Kolloid wirkt.

## 4.4 Ergebnisse

### 4.4.1 Stoffwechselergebnisse

Die Erholungsfähigkeit der Endothelzellen nahm über die Zeit bei allen Lagerungen ab, bei der Lagerung in Optisol stärker als bei den anderen beiden Lagerungen, was durch die stärker abfallenden SAN-Werte gegenüber der Kontrolle (130,16 nmol/g TG) zum Ausdruck kam (Optisol 7 Tage: 107,14 nmol/g TG, 14 Tage: 87,04 nmol/g TG).

Die aktuelle verfügbare Energie in Form von ATP nahm ebenfalls mit der Zeit gegenüber der Kontrolle (70,63 nmol/g TG) ab, wobei die Abnahme bei der Lagerung in Optisol (7 Tage: 64,02 nmol/g TG; 14 Tage: 51,85 nmol/g TG) am stärksten und bei der Lagerung in Chen-Medium (7 Tage: 79,63 nmol/g TG; 14 Tage: 69,84 nmol/g TG) am geringsten war. Dieser Abfall läßt sich allgemein auf die fehlende Sauerstoffzufuhr während der Lagerung zurückführen, ohne die keine ATP-Synthese möglich ist (siehe Kapitel 4.2.3). Zur Beurteilung des langfristigen Stoffwechselzustandes ist dann der SAN-Wert von besonderer Bedeutung, da dieser die Erholungsfähigkeit der Zellen nach wiederhergestellter Sauerstoffzufuhr und Energieproduktion widerspiegelt.

Die Lagerung in Optisol wies den stärksten ATP-Abfall bei gleichzeitig stärkstem Abfall der SAN-Werte gegenüber den anderen beiden Lagerungen auf. Ursächlich für den starken ATP-Abfall in dieser Gruppe könnte der negative Einfluß des in Optisol enthaltenen Dextrans auf den ATP-Gehalt sein (siehe Kapitel 4.3.3).

In einer Untersuchung zu Stoffwechselveränderungen humaner Corneae während Organkultur beschrieben Redbrake et al. ATP-Gehalte von über 100 nmol/g TG nach 7- und 15-tägiger Lagerung [Redbrake 1999], die deutlich über den von uns gemessenen Werten liegen (Inkubator 7 Tage: 78,84 nmol/g TG; 14 Tage: 106,61 nmol/g TG). Bei der Bewertung dieser Differenz ist zu bedenken, dass bei der Studie von Redbrake et al. die Adeninnukleotidgehalte der gesamten Cornea, somit auch von Epithel und Stroma, erfaßt wurden. Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf das Endothel, da dieses für den

Erfolg der Transplantation besonders wichtig ist (siehe Kapitel 4.4.2). Des weiteren erscheinen die von Redbrake et al. gemessenen ATP-Gehalte aufgrund der Standardabweichungen von fast 100% nicht reproduzierbar im Gegensatz zu unseren eigenen Werten mit deutlich geringeren Standardabweichungen.

Das ECP blieb in unseren Untersuchungen bei allen Lagerungen weitgehend unverändert gegenüber der Kontrollgruppe (0,79). Die akute Energielage der Zellen während hypothermer Lagerung und Organkultur, also das Verhältnis von ATP-Synthese und -Verbrauch, waren nach 1-tägiger Entquellphase bei allen Lagerungsformen wiederhergestellt.

Somit unterschieden sich die Lagerungen in der Erholungsfähigkeit und der Energieverfügbarkeit, wobei die Lagerung in Optisol hierbei die gravierendsten Abnahmen zu verzeichnen hatte.

#### **4.4.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen**

Die Zellzählung der intakten und defekten Zellen war ausschließlich innerhalb der intakten Teilbereiche der Cornea möglich. Diese Werte sind somit immer nur in Zusammenhang mit der prozentualen Erfassung der intakten Teilbereiche zu verstehen.

In unseren Versuchen mit 7- und 14 tägigen Lagerungen wiesen die Lagerungen in Optisol mit 69,5 und 27,2% die geringsten intakten Bereiche der Gesamtcornea auf. Auch war die Anzahl der vollständig defekten Corneae ( $\leq 10\%$  intakte Teilbereiche) bei dieser Lagerung mit 3 (20%) nach 7 Tagen und 9 (60%) nach 14 Tagen am höchsten.

Die intakten Bereiche der Gesamtcornea der Lagerungen in Chen-Medium waren mit 79,6% und 82,5% etwas niedriger als die der Kontrollgruppe (89,3%). Die 14-tägige Lagerung in Chen-Medium unterschied sich dabei signifikant von der gleichlangen Lagerung in Optisol. Besonders hervorzuheben ist, dass bei den Lagerungen in Chen-Medium, genauso wie bei der Kontrollgruppe, keine vollständig defekten Corneae vorgefunden wurden.

Ähnliche Ergebnisse fanden Chen et al. 1999 in einer klinischen Studie, in der humane Corneae für 11 Tage bei 4°C in Chen-Medium oder in Optisol gelagert wurden. Sie berichteten von zahlreichen interzellulären Ablösungen, die mit 42,4% bei der Lagerung in Optisol deutlich über denen der Lagerung in Chen-Medium (9,4%) lagen [Chen 1999].

Im Gegensatz dazu beschreiben Means et al. einen Endothelschaden von 9,5% nach 1 Woche und 11% nach 2 Wochen Lagerung in Optisol [Means 1995]. Auch Nelson et al. beschrieben in einer in vitro Studie einen mittleren Verlust der Endothelzelldichte von 5% nach 7- bis 14-tägiger Lagerung in Optisol. Der mittlere Verlust der in Chen-Medium gelagerten Zellen unterschied sich mit 11% jedoch nicht signifikant von der Lagerung in

Optisol [Nelson 2000].

Die sehr gegensätzlichen Ergebnisse könnten auf eine gewisse Voreingenommenheit gegenüber Optisol von Chen et al. zurückzuführen sein. Dagegen sprechen unsere eigenen Befunde bei denen nach 7 Tagen 30,5% defekte Bereiche und nach 14 Tagen 72,8% defekte Bereiche verzeichnet wurden. Auch Nelson et al. bestätigen Chen et al. für Chen-Medium nicht jedoch für Optisol-GS.

Die Zellzählung war wie bereits erläutert nur begrenzt relevant. So kam es bei der 7-tägigen Lagerung in Optisol zufällig zu höheren intakten Zellzahlen (4127 Zellen/mm<sup>2</sup>) als bei den anderen Gruppen, trotz reduzierter intakter Bereiche (69,5%) gegenüber der Kontrollgruppe (89,3%). Es kam somit offensichtlich zu einer Verringerung der Zellflächen im Rahmen der zunehmenden Reduktion der intakten Teilbereiche, möglicherweise aufgrund einer Zellschrumpfung. Erst eine massive Endothelschädigung wie bei der 14-tägigen Lagerung reduzierte die Zahl der intakten Zellen in den verbliebenen intakten Teilbereichen (Optisol 14 Tage: 27,2% intakte Bereiche, 3506 intakte Zellen/mm<sup>2</sup>). Es erschien deshalb wichtig nicht die Zahl der intakten oder defekten Zellen als Maßstab für die Endothelbeschaffenheit zu verwenden, sondern die prozentual erfaßten intakten Teilbereiche.

Die Anzahl der defekten Zellen war gleichbleibend, mit Ausnahme der 7-tägigen Lagerung in Optisol (54 defekte Zellen/mm<sup>2</sup>), die wie oben beschrieben eine Sonderstellung einnahm.

Einen vorrübergehenden Anstieg intakter Zellzahlen beobachtete Ellis et al. ebenfalls bei Untersuchungen des Corneaendothels von Schweinen bei gleichzeitiger Anstieg des Prozentsatzes der freigelegten Descemetischen Membran mit zunehmender Lagerungsdauer von 12% bei 5-tägiger auf 26% bei 10-tägiger Lagerung in 2,5% Chondroitinsulfatmedium [Ellis 1992]. Ellis et al. führte dies auf eine Zellschrumpfung von Seiten der freigelegten Bereiche zurück. Jedoch werden in dieser Studie Zellzahlen frischer Corneae von 6300 Zellen/mm<sup>2</sup> zugrunde gelegt, die nicht unseren eigenen Erfahrungen mit ungelagerten Corneae entsprechen (3871 Zellen/mm<sup>2</sup>) und für uns somit nicht nachvollziehbar sind.

Andere Ergebnisse lieferte eine experimentelle Studie, in der humane Corneae bis zu 151 Tagen in Optisol-GS gelagert und nach Zellfärbung die Endothelvitalität beurteilt wurde [Means 1995]. Nach Lagerung für 8 bis 14 Tage beschrieben sie eine Zellschädigung von bis zu 20%. Erst nach 67 Tagen betrug der Zellverlust 95 bis 100% [Means 1995]. Auffällig ist hierbei, dass nach 8 bis 14 Tagen 3 und nach 21 Tagen bereits 9 Corneae von der Untersuchung ausgeschlossen wurden. Auf den Verbleib dieser Corneae wird nicht näher eingegangen, es wäre jedoch möglich, dass es sich dabei um Corneae mit vollständig zer-

störtem Endothel handelte.

Die von uns erhobenen Befunde deuten darauf hin, dass es bei der Lagerung in Optisol zu einem schnell zunehmenden Verlust der Zellintegrität und einem damit verbundenen Verlust der Haftung an der Descemetischen Membran kommt. Ein Grund für die gravierende Endothelzellschädigung der in Optisol gelagerten Corneae könnte das in Optisol enthaltene Chondroitinsulfat sein. Einen direkten zytotoxischen Effekt des Chondroitinsulfats schlossen Chen et al. aus, jedoch wiesen sie eine sinkende Zelladhäsionsfähigkeit mit steigender Chondroitinsulfatkonzentration nach [Chen 1996]. Auch Dextransulfat senkt in gravierender Weise die Zelladhäsionsfähigkeit [Chen 1996].

Die von uns beobachtete schlechte Zellintegrität bei der Lagerung in Optisol-Medium erklärte, weshalb Lagerungszeiten von 3-5 Tagen in den Hornhautbanken nicht überschritten werden trotz der vom Hersteller eingeräumten 14 Tage. Chen et al. führten den guten Erhalt der Zellintegrität und die gute Vitalität der Zellen nach Lagerung in Chen-Medium auf die ermöglichte Regeneration von ATP und die Verhinderung einer laktatbedingten Azidose zurück [Chen 1997](siehe Kapitel 4.3.4).

Obwohl die Organkultur die meist genutzte Konservierungsmethode in Europa darstellt, sind Studien die Angaben über Zellzahl oder -integrität während der Lagerung liefern sehr spärlich.

Die im Inkubator gelagerten Corneae wiesen in unseren Untersuchungen mit 87,2% und 78,7% deutlich größere intakte Bereiche verglichen mit der Lagerung in Optisol-Medium auf. Auch war bei den Inkubatorlagerungen nur jeweils eine Cornea vollständig defekt. Gegenüber der Lagerung in Chen-Medium konnten hierbei keine Unterschiede festgestellt werden.

Pels et al. stellten 1983 fest, dass der Zellverlust der individuellen Corneae sehr unterschiedlich war und bezogen dies auf die natürliche Variation [Pels/Schuchard 1983]. Genaue Zahlen des Zellverlustes werden an dieser Stelle nicht angegeben. Auch wenn bei den Zahlen intakter und defekter Zellen keine signifikanten Unterschiede zu den hypothermen Lagerungen festzustellen waren, konnte ähnlich wie beim ECP eine Verbesserung der 14-tägigen gegenüber der 7-tägigen Lagerung beobachtet werden. Doughman et al. beobachteten ein ähnliches Phänomen und begründeten dies mit der Möglichkeit zur Reparatur des Endothels bei 34°C, da die Stoffwechselforgänge aufrecht erhalten werden [Doughman 1982].

In einer Übersichtsarbeit von Pels et al. 2007 wurden hypotherme Lagerung und Organkultur gegenüber gestellt. Es wurden keine Originaldaten publiziert, sondern für die Organkultur auf eigene Angaben aus dem Jahre 1986 zurückgegriffen, die in einem nicht zugreifbaren Buch veröffentlicht wurden. Die Zellverlustrate während Organkultur lag in

etwa bei 0% nach 12 Tagen und bei 3% nach 39 Tagen Organkultur [Pels 2007]. Bei den in dieser Arbeit verglichenen Kurven handelte es sich um Regressionsgraden, die bezogen auf die Organkultur nur auf der Angabe zweier Punkte beruhte und so nicht sehr aussagekräftig ist.

Die Zellintegrität und der Erhalt intakter und vitaler Zellen sind von besonderer Wichtigkeit für den Erfolg der Transplantation. Das Endothel der Cornea ist nur sehr bedingt regenerationsfähig. Corneae mit mehr als 20% Endothelverlust oder weniger als 2000 Zellen/mm<sup>2</sup> werden von der Transplantation ausgeschlossen. In einigen Institutionen liegt die Mindestzellzahl sogar bei 2500 Zellen/mm<sup>2</sup>. Da bei einer frischen Schweinecornea laut unseren Versuchen ca. 4000 Zellen/mm<sup>2</sup> zu erwarten sind, ist bei einem 20%-igen Endothelverlust bei dieser Spezies noch mit ca. 3200 Zellen/mm<sup>2</sup> zurechnen. Die Zellzahl ist also speziesabhängig sehr unterschiedlich und somit gelten die oben angegebenen Mindestzellzahlen nur für humane Corneae. Die Einhaltung dieser Mindestzellzahlen ist von besonderer Wichtigkeit kurzfristig aufgrund der operationsbedingten Zellverluste, langfristig aufgrund der altersbedingten Zellverluste nach Transplantation [Armitage 2003]. So reduzierte sich laut Berechnungen von Armitage et al. die Endothelzellzahl um mehr als die Hälfte innerhalb der ersten 5 Jahre nach durchgeführter Keratoplastik, was auch durch andere Studien bestätigt wurde [Bourne 1994]. Da es sich hierbei um Zellzahlreduktionen in transplantierten Corneae handelte, lassen sich daraus keine Rückschlüsse auf physiologische Zellzahlveränderungen nicht operierter Corneae ziehen. Die Ergebnisse von Armitage et al. verdeutlichen jedoch die Wichtigkeit des Endothelerhalts und die Einhaltung der Mindestzellzahlen vor der Transplantation.

Bourne et al. beobachteten einen beschleunigten progressiven Zellverlust innerhalb von 20 Jahren nach Transplantation. Sie vermuteten, dass diese erhöhte Zellverlustrate immunologisch bedingt war. Abstoßungsreaktionen sind der Hauptgrund für Transplantatversagen 5 Jahre nach der Operation [Bourne 1994].

Hagenah et al. verglichen die Endothelzelldichte von frischen und organ kultivierten Corneae 5 Jahre nach der Operation und konnten keine Unterschiede feststellen [Hagenah 1997]. Die Ergebnisse von Bourne et al. wurden in dessen Studie bestätigt.

#### **4.4.3 Ergebnisse der Corneadickenmessungen**

Die Dicke der Cornea ist von besonderer Bedeutung. Bei Veränderungen des Wassergehalts korreliert die Corneadicke invers eng mit ihrer Durchsichtigkeit. Die Transparenz ist abhängig von der optischen Homogenität des Gewebes. Wassereinlagerungen in das Stroma führen aufgrund des so veränderten Brechungsindex zur Trübung der Cornea

und so zur Undurchsichtigkeit. Der Wassergehalt der Cornea wird durch verschiedene Mechanismen reguliert [Kim 1994]. Die durch tight-junctions gebildete Endothelbarriere erlaubt einen passiven Wassereinstrom in das Corneastroma. Der Wasserabtransport aus dem Stroma geschieht mithilfe einer energieverbrauchenden Pumpe im Endothel. Der Wassergehalt des Stromas wird so konstant gehalten.

Eine herabgesetzte Pumpleistung aufgrund von mangelnder Energiebereitstellung oder Hypothermie führt so zu einer reduzierten Wasserabgabe und somit zu einer Dickenzunahme der Cornea. Diese führt wiederum zu einem Verlust der Zellintegrität aufgrund der Quellungsvorgänge und schädigt somit die endotheliale Pumpfunktion weiter. Ein dauerhafter Zusatz von osmotisch wirksamen Substanzen zu den Lagerungsmedien, der vorab eine Aufquellung der Cornea verhindert, ist deshalb schonender für das Endothel. Das stetige Aufquellen während der Lagerung und die anschließende 24 stündige Entquellung stellen eine Stresssituation für das Endothel dar. Die heute in der hypothermen Corneakonservierung gängigen osmotischen Substanzen wie Chondroitinsulfat und Dextran sind aufgrund ihrer möglichen Zelltoxizität und unerwünschter postoperativer Wirkungen dafür jedoch nur bedingt geeignet (siehe unten).

In unseren Versuchen quollen die im Inkubator gelagerten Corneae signifikant stärker auf als nach Lagerung in Chen- oder Optisol-Medium. Ursächlich dafür könnte der fehlende HES-Zusatz in der Organkulturlösung sein (siehe Kapitel 4.3.3). Auffällig ist, dass die Corneae der Kontrollgruppe nach 1 Tag ( $1977 \mu\text{m}$ ) trotz HES-Zusatz gegenüber den Corneae ohne Lagerung ( $1778 \mu\text{m}$ ) aufgequollen sind. Dieser Anstieg erscheint verglichen mit der signifikanten Dickenzunahme der 7-tägigen Lagerungen gegenüber der Kontrollgruppe gering.

In unseren Untersuchungen quollen die in Chenmedium gelagerten Corneae zunächst auf. Die Dicke der Corneae nahm jedoch von der 7- zur 14-tägigen Lagerung wie bei der Lagerung in Optisol wieder ab. Die Dickenreduktion um 4,6% beim Chen-Medium und 5,8% bei Optisol-GS könnte möglicherweise auf eine bessere 1-tägige Entquellung nach 14 Tagen Lagerung zurückzuführen sein.

Kim et al. postulierten 1994, dass die Endothelbarriere von in Optisol gelagerten Corneae für mindestens 14 Tage erhalten bleibe [Kim 1994]. Im Gegensatz dazu sind Chen et al. der Meinung, dass eine 14-tägige Lagerung in Optisol ohne Endotheldegeneration unrealistisch sei. Sie begründeten diese These mit einer herabgesetzten Enzymaktivität und einem folglich herabgesetzten metabolischen Stoffwechsel aufgrund der Serumfreiheit des Optisols [Chen 1996]. Unsere Versuche ergaben, dass weder eine 7- noch eine 14-tägige Lagerung in Optisol im Vergleich zu Chen-Medium aufgrund der gravierenden Zellschäden, trotz der geringen Aufquellung, zu empfehlen ist. Welches die kritische

Lagerungsdauer in Optisol-GS ist können wir nicht beurteilen, da in unserer Studie 7 Tage das kürzeste Kontrollintervall darstellte und die Zellschäden der in Optisol gelagerten Corneae zu diesem Zeitpunkt bereits gravierend waren.

Andere Autoren behaupten, dass sich ein Gleichgewicht zwischen dem Dextrangehalt und dem Medium einstelle. So wurde in einer experimentellen Studie an Kaninchencorneae der Dextrangehalt in Cornea und MK-Medium nach bis zu 72 stündiger Lagerung ermittelt [Hull 1976]. In einer weiteren Versuchsgruppe wurden Kaninchen in MK-Medium gelagerte Corneae für bis zu 24 Stunden transplantiert und der in der Cornea verbliebene Dextrangehalt ermittelt. Sie stellte sich nach ca. 24 Stunden Lagerung ein Gleichgewicht zwischen dem Dextrangehalt der Cornea und dem des MK-Mediums ein. Das so von der Cornea aufgenommene Dextran wurde postoperativ wieder abgegeben, wobei innerhalb von 12 Stunden 99% des Dextrans eliminiert wurden [Hull 1976]. Dies könnte die Begründung für das postoperativ erneute Anschwellen der in Optisol-GS gelagerten Corneae liefern, wie es in einigen Studien beschrieben wurde. Chen et al. stellten 1997 fest, dass der Aufquellungsprozess auch postoperativ für 3 bis 5 Tage anhielt und die Transparenz der Cornea danach nur sehr langsam wiederhergestellt wurde [Chen 1997].



## 5 Zusammenfassung

Ziel unserer Versuche war der Vergleich von zwei hypothermen Konservierungsmedien (Optisol- und Chen-Medium) und einem Organkulturmedium bezüglich der Qualität und Integrität des Corneaendothels nach erfolgter Lagerung.

Dazu wurde aus am Schlachthof enukleierten Schweinebulbi die Cornea mit 2 mm breitem Sklerarand excidiert. Die Lagerung der Corneae erfolgte in Organkulturmedium bei 34°C oder in Optisol- oder Chen-Medium bei 4°C für jeweils 7 oder 14 Tage. Nach anschließender 1-tägiger Entquellung bei 34°C in speziellem Organkulturmedium wurden die Endothelien der Corneae der mikroskopischen Untersuchung nach Trypanblau und Alizarin-rot Färbung oder der Adeninnukleotidmessung mittels HPLC unterzogen. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden die intakten Teilbereiche der Gesamtcornea, die Zahl der intakten und defekten Zellen und die Corneadicke ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten Corneae nach 1-tägiger Lagerung in Entquellmedium ohne vorangegangene Konservierung.

In unseren Versuchen mit 7- und 14-tägigen Lagerungen wiesen die Lagerungen in Optisol-Medium mit 69,5% und 27,2% die geringsten intakten Bereiche der Gesamtcornea auf. Auch war die Anzahl der vollständig defekten Corneae ( $\leq 10\%$  intakte Teilbereiche) mit 3 nach 7 Tagen und 9 nach 14 Tagen am höchsten. Die Zellzählung intakter und defekter Zellen war ausschließlich innerhalb der intakten Teilbereiche möglich und vernachlässigte die defekten Teilbereiche, sowie die vollständig defekten Corneae. Sie war daher nur begrenzt relevant. Die im Inkubator gelagerten Corneae quollen signifikant stärker auf als nach hypothermer Lagerung in Chen- oder Optisol-Medium.

Die metabolische Erholungsfähigkeit der Endothelzellen nahm bei allen Lagerungen ab, bei der Lagerung in Optisol-Medium stärker als bei den anderen beiden Lagerungen. Entsprechend war auch der ATP-Gehalt nach Erholung im Entquellmedium in den Optisolgruppen am niedrigsten. Das energy charge potential (ECP) war am Ende der 24-stündigen Erholung im Entquellmedium nach allen Lagerungsbedingungen weitgehend unverändert gegenüber der Kontrollgruppe. Unsere Untersuchungen haben somit gezeigt, dass die Lagerung in Chen-Medium bezüglich der Qualität, Integrität und energetischer Situation des Corneaendothels der Lagerung in Optisol-Medium überlegen ist. Wie die

Auswertung klinischer Publikationen zeigt, werden in den Hornhautbanken Lagerungszeiten von 3-5 Tagen in Optisol-Medium, trotz der vom Hersteller als sicher bezeichneten Lagerungszeit von 14 Tagen, nicht überschritten, was auf die schlechte Zellintegrität nach längeren Lagerungen in Optisol-Medium zurückzuführen sein könnte. Die Lagerung in Chen-Medium könnte somit eine längere Konservierungsdauer bei guter Zellintegrität und Erholungsfähigkeit des Corneaendothels gegenüber der Lagerung in Optisol-Medium ermöglichen und eine echte Alternative zur klinisch weitgehend verbreiteten Organkulturlagerung darstellen.

## 6 Summary

Aim of this study was to compare two hypothermic preservation media and one cell culture medium concerning the quality and integrity of the corneal endothelium after preservation. Corneae were excised with a 2 mm scleral rim out of pig globes enucleated in the slaughterhouse.

Corneae were either stored in organ culture medium at 34°C or in Optisol or Chen medium at 4°C, for 7 or 14 days each. After subsequent de-swelling for one day in specific organ culture medium at 34°C, the corneal endothelia were examined under the microscope after staining with Trypanblue and Alizarin-red or the adenine nucleotides were determined by means of HPLC. The microscopic examination consisted of the determination of the intact areas of the whole corneal endothelium, the number of intact and defective cells as well as the corneal swelling. Corneae after de-swelling for 1 day without preceding preservation served as control group.

With 69,5% and 27,2% the Optisol medium showed the lowest number of intact areas of the corneal endothelium out of the 7- and 14-days preservations. Also the number of completely defective corneae ( $\leq 10\%$  intact areas) was highest with 3 after 7 days and 9 after 14 days. Cell counts of intact and defective cells were only possible within the intact areas and neglected the defective areas as well as the completely defective corneae. Therefore the relevance of this counting was limited. The swelling of corneae stored in organ culture medium was significantly higher than after hypothermic storage in Chen or Optisol medium.

The metabolic recovering ability of the endothel cells decreased in all preservations, during preservation in Optisol medium more than during the two other types of preservation. Accordingly also the ATP content after recovery in the de-swelling medium was lowest within the Optisol groups. The energy charge potential (ECP) was largely unchanged by the end of the 24 hour recovery in de-swelling medium following all preservations compared to the control group. Thus our studies showed that storage in Chen medium is superior to the storage in Optisol medium regarding quality, integrity and energetic situation of the corneal endothelium.

In spite of a storage time of 14 days which is described as safe by the manufacturer, pu-

blished data from clinical eyebanks show that storage times of 3-5 days in Optisol medium are not exceeded, which could be attributed to the bad cell integrity after longer storage in Optisol medium. Therefore, storage in Chen medium could enable a longer preservation time with good cell integrity and recovering ability of corneal endothelium compared to the storage in Optisol medium, and could be a high quality alternative to the clinically largely utilized storage in organ culture medium.

# Literaturverzeichnis

- [Armitage/Easty 1997] W.J. ARMITAGE, D.L. EASTY  
*Factors Influencing the Suitability of Organ-Cultured Corneas for Transplantation*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 38(1); 16-24 (1997)
- [Armitage 2003] W.J. ARMITAGE, A.D. DICK, W.M. BOURNE  
*Predicting Endothelial Cell Loss and Long-Term Corneal Graft Survival*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 44(8); 3326-3331 (2003)
- [Atkinson 1968] D.E. ATKINSON  
*The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter*  
Biochemistry: 7; 4030-4034 (1968)
- [Bednarz 2001] J. BEDNARZ, V. DOUBILEI, P.C.M. WOLLNIK, K. ENGELMANN  
*Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells*  
Br J Ophthalmol: 85; 1416-1420 (2001)
- [Bourne 1994] W.M. BOURNE, D.O. HODGE, L.R. NELSON  
*Corneal Endothelium Five Years After Transplantation*  
Am J Ophthalmol: 118; 185-196 (1994)
- [Bourne 2001] W.M. BOURNE, L.R. NELSON, L.J. MAGUIRE, K.H. BARATZ, D.O. HODGE  
*Comparison of Chen Medium and Optisol-GS for Human Corneal Preservation at 4°C*  
Cornea: 20(7); 683-686 (2001)
- [Chen 1990] C.-H. CHEN, S.C. CHEN  
*Lactate Transport and Glycolytic Activity in the Freshly Isolated Rabbit Cornea*  
Arch Biochem Biophys: 276(1); 70-76 (1990)

- [Chen 1994] C.-H. CHEN, S.C. CHEN  
*The Efficacy of Non-lactate-generating Metabolites as Substrates for Maintaining Donor Tissues*  
Transplantation: 57; 1778-1785 (1994)
- [Chen 1996] C.-H. CHEN, V.N. CHEN, S.C. CHEN  
*Effect of Chondroitin Sulfate on the Endothelium in Corneal Storage*  
Cornea: 15(1); 35-40 (1996)
- [Chen 1997] C.-H. CHEN, P. RAMA, S.C. CHEN, F.N. SAN SOY  
*Efficacy of Media Enriched with Nonlactate-Generating Substrate for Organ Preservation*  
Transplantation: 63(5); 656-663 (1997)
- [Chen 1999] C.-H. CHEN, P. RAMA, A.H. CHEN, A. FRANCH, M. SULEWSKI, S. ORLIN, E.H. CHEN, S.-H. TSENG, H. LEE, C.-C. WANG, G.-Y. HUNG, M.Y. CHAN, M.-S. HUANG, S.C. CHEN  
*Efficacy of media enriched with nonlactate-generating substrate for organ preservation*  
Transplantation: 67(6); 800-808 (1999)
- [Chu 2000] W. CHU  
*The Past Twenty-five Years in Eye Banking*  
Cornea: 19(5); 754-765 (2000)
- [Doughman 1976] D.J. DOUGHMAN  
*Penetrating keratoplasty using 37°C organcultured corneae*  
Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol: 81; 778-793 (1976)
- [Doughman 1982] D.J. DOUGHMAN, J.E. HARRIS, E. MINDRUP, R.L. LINDSTROM  
*Prolonged Donor Cornea Preservation In Organ Culture: Long-Term Clinical Evaluation*  
Cornea: 1(1); 7-20 (1982)
- [Ellis 1992] M.F. ELLIS, C.N.J. MCGHEE, W.R. LEE  
*A Scanning Electron Microscope Study of Porcine Corneal Endothelium Stored in Chondroitin Sulphate*  
Cornea: 11(2); 127-132 (1992)

- 
- [Farrell 1991] P.L. FARRELL, J.T. FAN, R.E. SMITH, M.D. TROUSDALE  
*Donor Cornea Bacterial Contamination*  
Cornea: 10(5); 381-386 (1991)
- [Filatov 1935] V.P. FILATOV  
*Transplantation of the Cornea*  
Arch Ophthalmol: 13(3); 321-347 (1935)
- [Fischer 1995] J.H. FISCHER  
*Specific Detection of Nucleotides, Creatine Phosphate, and their Derivatives from Tissue Samples in a Simple, Isocratic, Recycling, Low-Volume System*  
LC · GC International: 8; 254-259 (1995)
- [George 2004] A.J.T. GEORGE, D.F.P. LARKIN  
*Corneal Transplantation: The Forgotten Graft*  
American Journal of Transplantation: 4; 678-685 (2004)
- [Glantz 1992] S.A. GLANTZ  
Primer of Biostatistics, 3rd ed, Singapore: McGraw-Hill (1992)
- [Hagenah 1995] M. HAGENAH, M. BÖHNKE, K. ENGELMANN, R. WINTER  
*Incidence of Bacterial and Fungal Contamination of Donor Corneas Preserved by Organ Culture*  
Cornea: 14(4); 423-426 (1995)
- [Hagenah 1996] M. HAGENAH, M. HALBERSTADT, S. WEHMING, H. BREWITT, R. WINTER  
*Hydroxyäthylstärke als Entquellungs-substanz in Kurzzeitkulturmedien für Spenderhornhäute*  
Klin Monatsbl Augenheilkd: 208; 107-111 (1996)
- [Hagenah 1997] M. HAGENAH, D. CARSTENS, M. BÖHNKE, R. WINTER  
*Entwicklung der Endothelzell-dichte bei Verwendung von frischem und organ-kultiviertem Gewebe*  
Der Ophthalmologe: 94; 90-93 (1997)
- [Hassan/Wilhelmus 2005] S.S. HASSAN, K.R. WILHELMUS  
*Eye-banking Risk Factors for Fungal Endophthalmitis Compared With Bacterial Endophthalmitis After Corneal Transplantation*  
Am J Ophthalmol: 139(4); 685-690 (2005)

- [Hull 1976] D.S. HULL, K. GREEN, K. BOWMAN  
*Dextran uptake into, and loss from, corneas stored in intermediate-term preservation*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 15(8); 663-666 (1976)
- [Jeng 2006] B.H. JENG  
*Preserving the cornea: corneal storage media*  
Curr Opin Ophthalmol: 17; 332-337 (2006)
- [Kapur 2006] R. KAPUR, E.Y. TU, S.L. PENDLAND, R. FISCELLA, J. SUGAR  
*The Effect of Temperature on the Antimicrobial Activity of Optisol-GS*  
Cornea: 25(3); 319-324 (2006)
- [Kaufman 1985] H.E. KAUFMAN, E.D. VARNELL, S. KAUFMAN, R.W. BEUERMAN, B.A. BARRON  
*K-Sol Corneal Preservation*  
Am J Ophthalmol: 100; 299-304 (1985)
- [Kaufman 1991] H.E. KAUFMAN, R.W. BEUERMAN, T.L. STEINEMANN, H.W. THOMPSON, E.D. VARNELL  
*Optisol Corneal Storage Medium*  
Arch Ophthalmol: 109; 864-868 (1991)
- [Kim 1994] K.-S. KIM, H.F. EDELHAUSER, G.P. HOLLEY, D.H. GEROSKI, M. LYNN, G.E. WALSH  
*Corneal Endothelial Permeability of Human Tissue After Storage in Optisol*  
Am J Ophthalmol: 117(3); 385-393 (1994)
- [Lass 1994] J.H. LASS, S.C. PUTMAN, W.E. BRUNER, D.B. CANO, J.V. GREINER, T. GLONEK  
*The Effect of hEGF and Insulin on Corneal Metabolism During Optisol Storage*  
Cornea: 13(3); 243-249 (1994)
- [Lindstrom 1986] R.L. LINDSTROM, D.J. DOUGHMAN, D.L. SKELNIK, E.A. MINDRUP  
*Minnesota system corneal preservation*  
Br J Ophthalmol: 70; 47-54 (1986)

- 
- [McCarey/Kaufman 1974] B.E. MCCAREY, H.E. KAUFMAN  
*Improved corneal storage*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 13(3); 165-173 (1974)
- [Means 1995] T.L. MEANS  
*Viability of Human Corneal Endothelium Following Optisol-GS Storage*  
Arch Ophthalmol: 13; 805-809 (1995)
- [Melles 1999] G.R.J. MELLES, F. LANDER, W. HOUDIJN BEEKHUIS, L. REMEIJER,  
P.S. BINDER  
*Posterior Lamellar Keratoplasty for a Case of Pseudophakic Bullous Keratopathy*  
Am J Ophthalmol: 127(3); 340-341 (1999)
- [Melles 2004] G.R.J. MELLES, R.H.J. WIJDH, C.P. NIEUWENDAAL  
*A Technique to Excise the Descemet Membrane From a Recipient Cornea (Descemetorhexis)*  
Cornea: 23(3); 286-288 (2004)
- [Meltendorf 2007] C. MELTENDORF, C. OHRLOFF, P. RIECK, J. SCHROETER  
*Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions*  
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol: 245(1); 143-147 (2007)
- [Müller 1988] M.C. MÜLLER, U. JACOBSEN, G. MICHELS, G. LIEDTKE, M. REIM  
*Organ Culture of Pig Cornea: Biochemical Analyses of Mid-Term-Stored Corneal Tissue*  
Ophthalmic Res: 20; 44-53 (1988)
- [Nelson 2000] L.R. NELSON, D.O. HODGE, W.M. BOURNE  
*In Vitro Comparison of Chen Medium and Optisol-GS Medium for Human Corneal Storage*  
Cornea: 19(6); 782-787 (2000)
- [Pels/Schuchard 1983] E. PELS, Y. SCHUCHARD  
*Organ-culture preservation of human corneas*  
Documenta Ophthalmologica: 53; 147-153 (1983)
- [Pels 2007] E. PELS, H. BEELE, I. CLAERHOUT  
*Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage*  
Int Ophthalmol: in press

- [Price 2006] F.W. PRICE JR, M.O. PRICE  
*Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes*  
J Cataract Refract Surg: 32; 411-418 (2006)
- [Redbrake 1999] C. REDBRAKE, S. SALLA, A. FRANTZ, M. REIM  
*Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture*  
Acta Ophthalmol Scand: 77; 266-272 (1999)
- [Redbrake 2006] C. REDBRAKE, S. KOMPA, G. ALTMANN, M. REIM, O. AREND  
*HES 130 als Dauerzusatz in der Organkultur humaner Hornhäute?*  
Ophthalmologe: 103; 43-47 (2006)
- [Redbrake-Adams 1999] C. REDBRAKE-ADAMS  
*Arbeitsanleitung Hornhautbank Aachen*  
(1999)
- [Reim 2001] M. REIM, F.J. PANTENBURG, C.D. ZIEGLER  
*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 (2001)
- [Ritterband 2007] D.C. RITTERBAND, M.K. SHAH, S.W. MESKIN, J.A. SEEDOR, R.S. KOPLIN, W. PEREZ, R. YANG, D.N. HU, P. DAHL  
*Efficacy and Safety of Voriconazole as an Additive in Optisol GS*  
Cornea: 26(3); 343-347 (2007)
- [Singh 1985/86] G. SINGH, M. BÖHNKE, D. VON-DOMARUS, J. DRAEGER, R.L. LINDSTROM, D.J. DOUGHMAN  
*Vital Staining of Corneal Endothelium*  
Cornea: 4(2); 80-91 (1985/1986)
- [Skelnik 1988] D.L. SKELNIK, C.S. PEARLSTEIN, E.A. MINDRUP  
*Corneal preservation at 4°C with chondroitin sulfate containing medium supplemented with dextran and epidermal growth factor (EGF)*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 29(suppl); 111 (1988)
- [Sobottka Ventura 1999] A.C. SOBOTTKA VENTURA, K. ENGELMANN, M. BÖHNKE  
*Fetal Calf Serum Protects Cultured Porcine Corneal Endothelial Cells from Endotoxin-Mediated Cell Damage*  
Ophthalmic Res: 31; 416-425 (1999)

- 
- [Spence/Peyman 1976] D.J. SPENCE, G.A. PEYMAN  
*A new technique for the vital staining of the corneal endothelium*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 15(12); 1000-1002 (1976)
- [Sperling 1976] S. SPERLING  
*Combined Staining of Corneal Endothelium by Alizarin Red and Trypane Blue*  
Acta Ophthalmologica: 55; 573-580 (1976)
- [Taylor/Hunt 1981] M.J. TAYLOR, C.J. HUNT  
*Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction*  
Br J Ophthalmol: 65; 815-819 (1981)
- [Terry 2006] M.A. TERRY  
*Endothelial Keratoplasty: History, Current State, and Future Directions*  
Cornea: 25(8); 873-878 (2006)
- [Thuret 2005] G. THURET, C. MANISSOLLE, L. CAMPOS-GUYOTAT, P. GAIN  
*Animal Compound-Free Medium and Poloxamer for Human Corneal Organ Culture and Deswelling*  
Investigative Ophthalmology & Visual Science: 46(3); 816-822 (2005)
- [van der Want 1983] H.J.L. VAN DER WANT, E. PELS, Y. SCHUCHARD, B. OLESEN, S. SPERLING  
*Electron Microscopy of Cultured Human Corneas*  
Arch Ophthalmol: 101; 1920-1926 (1983)
- [Walkenbach 1991] R.J. WALKENBACH, F. BONEY, G.-S. YE  
*The effects of UW solution and its components on corneal thickness during and after storage*  
Current Eye Research: 10(12); 1129-1136 (1991)
- [Williams 2007] K.A. WILLIAMS, D.J. COSTER  
*The Immunobiology of Corneal Transplantation*  
Transplantation: 84; 806-813 (2007)
- [Yap 2001] C. YAP, A.M.F. WONG, J. NAOR, D.S. ROOTMAN  
*Corneal Temperature Reversal After Storage in Chen Medium Compared With Optisol GS*  
Cornea: 20(5); 501-504 (2001)

[Zirm 1906] E. ZIRM

*Eine erfolgreiche totale Keratoplastik*

Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmol: 64; 580-593 (1906)

# Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. H. Fischer für die freundliche Überlassung des Themas und die persönliche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Auswertung der Versuche. Seine Tür war immer für konstruktive Gespräche und hilfreiche Anregungen geöffnet.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner danke ich für die freundliche Übernahme und Vertretung der Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Iris Wisser für die ausdauernde Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und ihrer Fahrbereitschaft zur Sporthochschule, sowie bei Frau Manuela Lerwe für die Durchführung der biochemischen Analysen und die gewissenhafte Anleitung bei der Laborarbeit.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Medizin, die durch ihre Unterstützung zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern, meiner Familie und Marco danke ich für die ausdauernde Motivation, ihre Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele und das orthographische Korrekturlesen.

Ulrike Haupricht danke ich für die Reaktivierung meines englischen Sprachvermögens.