

**Aus der Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Rainer Sundmacher**

**Titel**

**Langzeitprognose der homologen korneolimbalen Transplantation unter besonderer  
Berücksichtigung des HLA-Matching und der Immunsuppression**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität**

**Düsseldorf**

**Vorgelegt von**

**Theodoros Kontopoulos**

**2006**

“Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen fakultätder Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Herr Professor Dr. med. Guido Kluxen

Korreferent: Herr PD Dr. med. Ulrich Germing

## Danksagung

Ich danke meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Thomas Reinhard für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende und intensive Betreuung der Arbeit. Ich danke ebenfalls meinen Referenten Herrn Professor Dr. med. Guido Kluxen und Korreferenten Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Germing für die weitere Betreuung der Arbeit. Herrn Dr. med Daniel Böhringer danke ich herzlich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit und Christina Angelopoulos für die kritische Dursicht des Manuskripts und sprachliche Optimierung. Letztens danke ich ganz herzlich meine Eltern und Freunde für Ihre Unterstützung.

<b>Gliederung</b>	
<b>1 Hintergrund</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Keratoplastik</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Limbus</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Limbusinsuffizienz</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Klinik und Diagnose der Limbusinsuffizienz</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Therapie der Limbusinsuffizienz</b>	<b>12</b>
<b>1.5.1 Therapie der partiellen Limbusinsuffizienz</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2 Therapie der totalen Limbusinsuffizienz</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2.1 Autologe Limbustransplantation</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2.2 Homologe Limbustransplantation</b>	<b>20</b>
<b>1.5.2.3 Homologe zentrale Limbo-Keratoplastik</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Tripel Operation</b>	<b>27</b>
<b>1.7 Hornhauttransplantate</b>	<b>27</b>
<b>1.7.1 Ausschlusskriterien für die Hornhautspende</b>	<b>27</b>
<b>1.7.2 Gewebetypisierung (HLA-Matching)</b>	<b>29</b>
<b>1.8 Immunsuppression</b>	<b>31</b>
<b>1.8.1 Steroide</b>	<b>32</b>
<b>1.8.2 Cyclosporin A</b>	<b>33</b>
<b>1.8.3 Mycophenolat Mofetil</b>	<b>34</b>
<b>1.9 Transplantatprognose verschlechternde Faktoren</b>	<b>35</b>
<b>1.10 Immunreaktionen</b>	<b>38</b>
<b>1.11 Visusauswertung</b>	<b>39</b>
<b>1.12 Studiendesign und Fragestellung</b>	<b>40</b>
<b>2 Patienten und Methoden</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Patienten</b>	<b>41</b>
<b>2.2 Hornhautspender</b>	<b>42</b>
<b>2.3 HLA-Matching</b>	<b>44</b>
<b>2.4 Perforierende Keratoplastik mit Limbus</b>	<b>44</b>
<b>2.4.1 Technik der homologen zentralen Limbo-Keratoplastik</b>	<b>44</b>
<b>2.4.2 Tripel-Operation</b>	<b>45</b>
<b>2.5 Nachbehandlung</b>	<b>46</b>

<b>2.5.1 Standardtherapie nach der Keratoplastik</b>	<b>46</b>
<b>2.5.2 Systemische Immunsuppression</b>	<b>47</b>
<b>2.5.2.1 Cyclosporin A</b>	<b>47</b>
<b>2.5.2.2 Mycophenolat Mofetil (MMF)</b>	<b>48</b>
<b>2.5.2.3 Systemische Immunsuppressionsdauer</b>	<b>48</b>
<b>2.5.2.4 Voruntersuchung des Patienten</b>	<b>49</b>
<b>2.5.3 Chirurgische Eingriffe nach der Keratoplastik</b>	<b>50</b>
<b>2.6 Postoperative Kontrollen</b>	<b>50</b>
<b>2.6.1 Untersuchungsablauf</b>	<b>51</b>
<b>2.7 Immunreaktionen</b>	<b>51</b>
<b>2.8 Funktion des Limbus / Abradate</b>	<b>52</b>
<b>2.9 Statistische Auswertungen</b>	<b>53</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Überlebensanalysen der Hauptgruppe</b>	<b>55</b>
<b>3.2 Ursachen des Transplantatversagens</b>	<b>59</b>
<b>3.3 Verteilung der Immunreaktionen</b>	<b>60</b>
<b>3.4 Systemische Immunsuppression</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Visusprognose</b>	<b>63</b>
<b>3.6 Überlebensprognose im Vergleich zum Transplantatdurchmesser</b>	<b>66</b>
<b>3.7 Immunogenetische Analyse</b>	<b>67</b>
<b>3.8 Nebenwirkungen der systemischen Immunsuppression</b>	<b>70</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>4.1 HLA-Matching</b>	<b>72</b>
<b>4.2 Immunogenetische Analyse</b>	<b>74</b>
<b>4.3 Immunsuppression</b>	<b>77</b>
<b>5 Schlussfolgerung</b>	<b>79</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7 Abkürzungen</b>	<b>81</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>104</b>

## **1 Hintergrund**

Die Geschichte der Hornhauttransplantation umfasst einen Zeitraum von mehr als 150 Jahren. Kissam führte die erste perforierende Hornhauttransplantation durch, als er 1838 einem Menschen eine Hornhaut von einem Schwein transplantierte. Retrospektiv gesehen würde sich niemand wundern, dass dieser Eingriff erfolglos war und das Xenograft abgestoßen wurde. Die Erfolglosigkeit sowohl der perforierenden und lamellären Keratoplastik als auch der Keratoprothese wurde mit erheblichen technischen Schwierigkeiten begründet. Wenn auch von Hippels Ergebnisse nicht unbedingt erfolgreich waren, so hatte er dennoch mit der Entwicklung des Rundtrepans einen entscheidenden Beitrag zur Lösung dieser technischen Schwierigkeiten geleistet (von Hippel 1877, 1878, 1888). 1906 berichtete Zirm über die erste erfolgreiche homologe perforierende Keratoplastik am Menschen (Zirm 1906). In den folgenden Jahren wurden die operativen Verfahren stetig weiter verbessert. Als Beispiele sind zu nennen: die Einführung der Operation mit dem binokularen Mikroskop (Franceschetti 1939-1955) und die Verwendung des fortlaufenden monophilen Kunststofffadens (Harms 1954, 1957).

### **1.1 Keratoplastik**

In Deutschland werden pro Jahr ca. 4000 Hornhäute transplantiert. Allerdings liegt der jährliche Bedarf mit 6000-7000 Hornhäuten viel höher (Sundmacher 2001).

Es werden Normalrisiko- von Hochrisikokeratoplastiken unterschieden. Die Normalrisikokeratoplastik zeichnet sich durch eine mittelfristig hervorragende Prognose aus. Die exzellente Prognose der Korneatransplantate kann größtenteils dem immunologischen Privileg des vorderen Augenabschnitts, unter anderem ACAID (Anterior Chamber Associated Immune Deviation) (Niederkom 1996, Streilein 1996, Streilein 1999), zugeschrieben werden. Der Begriff „immune deviation“ lässt andeuten, dass es sich um eine Abweichung der Immunantwort von derjenigen in anderen Körperregionen handelt. Wird ein Fremdartigen in die Augenvorderkammer eingebracht, bleibt eine Immunreaktion nicht aus. Es wird ein antigenspezifischer, immunregulierter Effekt beobachtet. Kennzeichen dieses protektiven Systems sind:

- Einschränkung der zellmedierten Immunität

- Fehlen einer Immunantwort vom verzögerten Typ („DTH Reaktion“)
- Generierung von zytotoxischen Lymphozyten

Die Induktion des spezifischen Vorderkammerprivilegs kann durch eine Vielzahl von Antigenen, insbesondere auch durch Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene erfolgen. Eine antigenspezifische Immunsuppression mit Beteiligung der Milz wird generiert. Dabei sind lösliche Mediatoren beteiligt. Unter anderem kann TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-  $\beta$ ) identifiziert werden, der auf proinflammatorisch wirksamen Zytokinen (TNF-alpha, gamma Interferon) supprimierend wirkt (Ferguson 1987, Wilbanks 1991). Als Zytokine werden Substanzen bezeichnet, die von Zellen des Immunsystems nach Stimulation gebildet werden und als interzelluläre Botenstoffe wirken. Ein weiterer protektiver Mechanismus wird in einer gezielten „Apoptosis“, das heißt einem suizidalen Zelluntergang in der Vorderkammer des Auges gesehen.

Durch diese physiologische „Immunsuppression“ wird bei Normalrisiko-Keratoplastiken ohne Anwendung systemischer Immunsuppressiva und HLA-Matching eine 5-Jahres-Transplantat-Überlebensrate von bis zu 95% erreicht (Sharif 1991, Girard 1993, Reinhard 1996, Schönherr 1996, Streilein 1999).

Postoperativ bedürfen sie im Gegensatz zu Hochrisiko-Keratoplastiken mit wesentlich schlechterer Prognose erheblich weniger therapeutischer Anstrengungen.

In der Literatur wurde für die Definition der Hochrisiko-Keratoplastiken immer das gemeinsame Kriterium des erhöhten Risikos für Immunreaktionen als entscheidend angesehen. Eine Orientierung bei den Einteilungen der Hochrisiko-Keratoplastiken erfolgte nur auf Grund der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Immunreaktionen. Eine differenzierende Versagensanalyse wurde 1983 von Sundmacher und 1995 von Reinhard vorgestellt.

Einschlusskriterien für Hochrisiko-Keratoplastiken gibt es beim Vorliegen einer Konjunktivalisierung der Hornhaut in drei von vier Quadranten, im Falle einer Anamnese bereits durchgeführter Hornhauttransplantationen, beim Vorhandensein schwerer atopischer Dermatitis, bei steroidinduziertem Glaukom, bei der Ausführung von Transplantationen mit hoch immunogenen Transplantaten wie bei der Limbo-Keratoplastik oder bei der Positionierung des Transplantates in der Nähe des Limbus. Für jedes einzelne Kriterium ist aus der Literatur bekannt, dass seine Erfüllung in der Regel zu einer Verschlechterung der Prognose führt.

## 1.2 Limbus

Der Limbus erfüllt mehrere Funktionen, davon zwei Essentielle für die Erhaltung der kornealen Oberfläche:

- Er ist der elektive Sitz der Stammzellen des Hornhautepithels und ermöglicht die Regeneration der Epithelzellen.

- Er repräsentiert eine nicht nur eine anatomische sondern auch eine funktionelle Barriere zwischen der Konjunktiva und der Kornea. Das Verschwinden des Limbus begünstigt die Invasion der Hornhaut durch eine Proliferation von konjunktivalem Gewebe (Gatinel 2000).

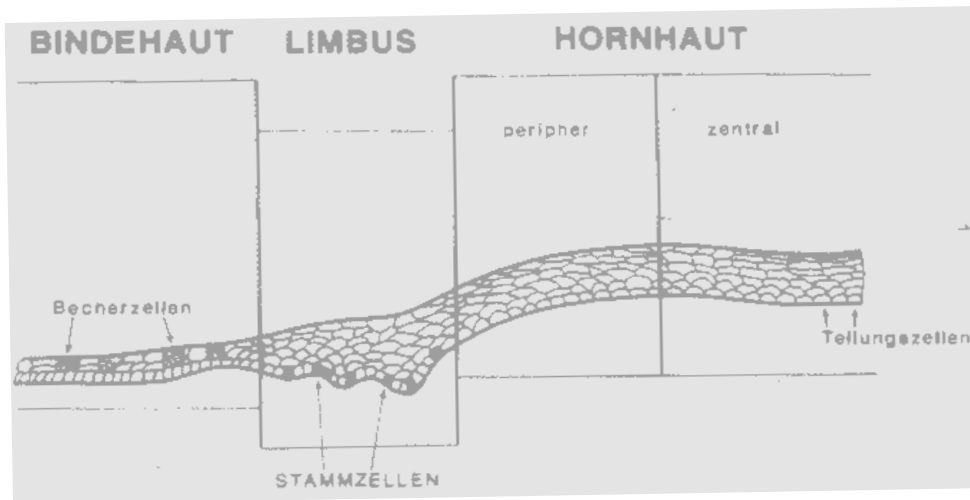
Der Nachweis kornealer Stammzellen beruht auf der Beschreibung einer Population sehr jugendlicher, undifferenzierter Zellen, in denen bestimmte, für differenzierte Zellen typische intrazelluläre Proteine, wie z.B. die Keratine 3 und 12, noch nicht vorkommen (Chaloin-Dufau 1990, Kurpakus 1990, Schermer 1986). Zellkinetische Untersuchungen bestätigen die Anwesenheit von sich langsam teilenden Zellen im basalen Limbusepithel, die ebenso wie Stammzellen der Epidermis gegen Differenzierungseinflüsse resistent sind (Cotsarelis 1989, Kruse 1993, Tseng 1995). Darüber hinaus charakterisieren verschiedene Strukturproteine (wie z.B. Keratin 19, Alpha Enolase oder EGF-Rezeptor) das basale Limbusepithel als eigenständige Einheit mit einer spezifischen Mikroarchitektur. Es ist jedoch noch keine histologische Unterscheidung zwischen den darin befindlichen Stamm- und Teilungszellen möglich (Lauweryns 1993, Zieske 1992, 1993). Für das Vorhandensein einer Zellpopulation mit definierten intrazellulären Bedingungen spricht auch, dass im basalen Limbusepithel spezielle Proteine fehlen, die einen Flüssigkeitsaustausch zwischen Hornhautepithelzellen ermöglichen (Matic 1997). Einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer Identifikation kornealer Stammzellen stellt der Nachweis von p63 in Zellen des basalen Limbusepithels dar (Pellegrini 2001).

Das Epithel des kornealen Limbus formt ungefähr 10 Zellschichten (Golberg 1982, Greiner 1979). Es enthält Melanozyten, Langerhans-Zellen aber keine kalziformen Zellen (Bodaghi 1994). Das unten liegende Stroma enthält ein dichtes vaskuläres Netz und ist durch eine Serie von radiären Strukturen (Erhebungen) organisiert. Im Zentrum dieser Strukturen befindet sich eine fibrovaskuläre Achse namens Pallisaden von Vogt (Golberg 1982, Townsend 1991). Die basalen Zellen des Limbus spielen eine wichtige Rolle zur Erneuerung und Erhaltung des kornealen Epithels. Sie besitzen eine verlängerte Lebensdauer mit einem langen zellulären



Zyklus und einer kurzen S-Phase. Jede zelluläre Teilung ist asymmetrisch; die eine Zelle ist für die Rekonstitution des Stammzellpools bestimmt, die zweite differenziert sich und erlangt schrittweise die Charakteristika der Zellen des Gewebes, für das sie bestimmt ist (Tseng 1989, Hall 1989, Zieske 1994, Schermer 1986).

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Limbus (nach Kruse)



### 1.3 Limbusinsuffizienz

Das Defizit von Limbusstammzellen ist eine gut definierte Entität. Es ist der Ausdruck eines doppelten Prozesses:

- eine qualitativ und/oder quantitativ insuffiziente Regeneration des kornealen Epithels;
- die korneale Invasion durch eine fibrovaskuläre Proliferation konjunktivaler Herkunft. Dieser Prozess der Konjunktivalisierung lässt sich vereinfacht mit einer Störung der proliferativen Barriere erklären, die unter physiologischen Bedingungen von den Stamm- und Teilungszellen am Limbus gebildet wird.

Der Terminus Defizit lässt nicht auf einen kongenitalen (Agenesie, Dysgenesie), funktionellen (neurologische, endokrinologische Dysregulation) oder hereditären (physischer Mechanismus, Verätzung, Verbrennung, Infektion) Charakter schließen. Er beschreibt lediglich die Unfähigkeit der Stammzellen des Limbus die normale Regeneration des kornealen Epithels zu gewährleisten.

Je nach Ätiologie kann zwischen einer primären oder sekundären Insuffizienz unterschieden werden, deren Ursachen nachfolgend aufgeführt sind.

### **Ätiologie der Limbusinsuffizienz**

(Ellies P 1985, Ellies P 2001, Fujishima 1996, Holland EJ 2000, Kruse FE 1994, Kruse FE 1996, Puangrichareern V 1995, Schwarz 1998, Sridhar MS 2001, Tseng SCG 1989, Tseng SCG 1990)

### **Primäre Limbusinsuffizienz**

Kongenitale Aniridie  
Erythrokeratodermie Typ Burns  
Keratitis bei endokriner Insuffizienz  
Sklerokornea

### **Sekundäre Limbusinsuffizienz**

Verätzungen (Laugen oder Säuren)  
Verbrennungen  
Kontaktlinsen-Keratopathie  
Wiederholte chirurgische Eingriffe am Limbus  
Stevens-Johnson Syndrom  
Atopische Blepharitis und Keratokonjunktivitis  
Narbenbildendes Pemphigoid  
Mikrobielle Keratitis  
Bestrahlung  
Chemotherapie

### **Partielle / totale Limbusinsuffizienz**

Es wird eine partielle von einer totalen Limbusstammzellinsuffizienz unterschieden.

Bei der partiellen Insuffizienz der Limbusstammzellen kommt es zu einer lokal begrenzten Zerstörung des Limbus. Von der lokalen Störung dieser Randregion wächst ein vaskularisierter Pannus auf die Hornhaut vor und kann das Sehvermögen erheblich beeinträchtigen. Man sollte betonen, dass die Heilungs- und Regenerationsstörung der Epithelzellen der Hornhaut vom

Ausmaß des Schadens der Stammzellen abhängig ist. Chen (1990) zeigte in seiner experimentellen Studie, dass beim Fehlen von bis zu zwei Dritteln des Limbusepithels, nur ein Viertel der Augen eine Wundheilungsstörung aufweist. Bei der Mehrzahl der Versuchstiere reicht jedoch ein Drittel des Limbus für eine regelrechte Wundheilung aus. Es können also mehr als die Hälfte der Stammzellen verloren gehen, ohne dass es zu Störungen der Erneuerung des Hornhautepithels kommen muss. Verletzungen, bei denen nur die oberflächliche Schicht des Limbusepithels betroffen ist und die Stammzellen erhalten bleiben, sind nur dann problematisch, wenn es zu einem gleichzeitigen Verlust des gesamten Hornhautepithels kommt (Chen 1991).

Die totale Limbusstammzellinsuffizienz ist begleitet von einer Konjunktivalisierung und Vaskularisierung der Hornhaut. Diese Tatsache wurde von zahlreichen experimentellen Studien bewiesen (Huang 1988, Chen 1990, Kruse 1990). Die Studie von Chen (1990) untersuchte die oberflächliche korneale Wundheilung im Kaninchen-Modell nach chirurgischer Entfernung des kompletten Limbus. Dabei wurde die limbische Zone mit 2 mm der peripheren Hornhaut und 3 mm der Konjunktiva entfernt. Nach 2 konsekutiven epithelialen Hornhaut-Debridementen zeigten die Hornhäute eine Wundheilungsstörung. Diese wurde durch die verspätete Heilung, rezidivierende Erosionen, fortschreitende Hornhautvaskularisation und Konjunktivalisierung des entstandenen epithelialen Phänotyps gekennzeichnet. In weiteren Studien (Tseng 1984, Tseng 1987, Huang 1988, Kinoshita 1983) betrug die Inzidenz für das Auftreten einer Konjunktivalisierung und Vaskularisierung des Hornhautepithels bis zu 68%, wenn Hornhautepithelien von Kaninchen komplett durch n-Heptanol zerstört wurden.

#### **1.4 Klinik und Diagnose der Limbusinsuffizienz**

Das Verschwinden der limbalen Barriere provoziert unter bestimmten pathologischen Bedingungen die Migration des konjunktivalen Epithels auf die Hornhautoberfläche (Kruse 1994, Schwarz 1998, Tseng 1989, Tseng 1990). Der Prozess des Einwachsens von vaskularisierter Bindehaut auf die Hornhautoberfläche wird als Konjunktivalisierung der Hornhaut bezeichnet (Meller 2001). Dieses charakteristische Krankheitsbild geht primär von einer Epithelveränderung aus. Der Reepithelialisierungsprozess kann verlangsamt oder von schlechter Qualität sein: die Hornhautoberfläche zeigt einen irregulären Aspekt mit möglichem Auftreten von rezidivierenden oder persistierenden Erosionen, aus denen Hornhautulzera

entstehen können. (Hirst 1982, Chen 1990, Huang1991, Muraine 2000, Kruse 2001). Stromale und / oder oberflächliche Neovaskularisationen können als Vorstadium eines entzündlichen Infiltrates (Tseng SCG 1989, Chen 1990) und zusammen mit Einlagerung von Fetten oder kalziformen Zellen vorkommen.

Außer klinischen Zeichen besteht eine Assoziation mit funktionellen Parametern wie Visusverlust, Photophobie, Schmerzen von variabler Intensität und Blepharospasmus.

Diagnostisch ist ein biomikroskopisch festgestellter Verlust der Vogtschen Limbuspallisaden hilfreich (Tseng 1990); jedoch kann die Architektur der Limbuspallisaden auch im Normalzustand heterogen sein und Veränderungen sollten vorsichtig interpretiert werden (Dua 2000). Mehr diagnostische Sicherheit bietet die Fluoreszeinfärbung und die Impressionszytologie. Nach Kontakt mit Fluoreszein kommt es zu einer pathologischen Färbung der konjunktivalisierten Hornhaut, die verzögert zu beobachten ist (Dua 1994, 1998). Das wichtigste Kriterium für die Limbusinsuffizienz und der Beweis für das Vorliegen dieser Erkrankung ist das Vorkommen von Becherzellen im Hornhautepithel (Puangsricharern 1995, Tseng 1988). Eine Ausnahme dieser Regel betrifft unter anderem das okuläre Pemphigoid und das Lyell Syndrom.

### **1.5 Therapie der Limbusinsuffizienz**

Die funktionelle Prognostik der Behandlung von kornealen Oberflächenstörungen ist essentiell von der Qualität der anatomischen Restaurierung der diversen epithelialen Bestandteile, insbesondere des Hornhautepithels wegen seiner tragenden Rolle in der Zusammensetzung der optischen Achse, abhängig. Im Falle einer sekundären Alterierung der kornealen Oberfläche, die durch einen Befall der limbalen Barriere oder ihrem Reservoir an Stammzellen verursacht wird, sollte die Therapie drei Schwerpunkte haben:

Erstens sollte die Hornhaut vor einer konjunktivalen Invasion geschützt und die Proliferation, die Migration und Adhäsion der residualen Hornhautepithelzellen auf die Hornhautoberfläche begünstigt werden.

Zweitens sollten die fehlenden Stammzellen wieder ersetzt werden.

Drittens sollte die stromale limbale Umgebung repariert werden, um ihre Rolle bei der Unterstützung der verbliebenen oder transplantierten Stammzellen zu erfüllen. Das ist deshalb

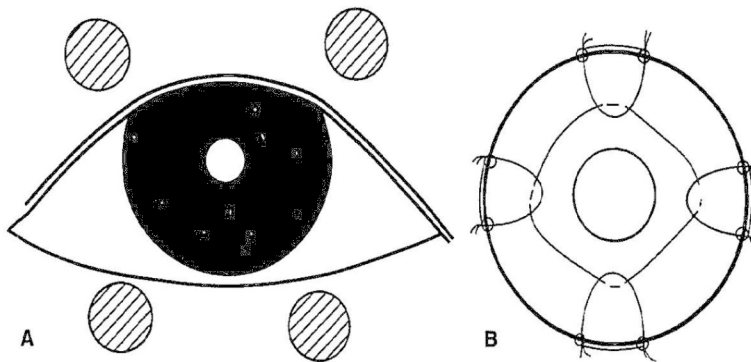
wichtig, weil die Funktion kornealer Stammzellen von den Fibroblasten im Limbusstroma abhängig zu sein scheint (Alpek 1999, Li 1995).

Die ersten Techniken der epithelialen Transplantation wurden vor der Etablierung des Stammzellmodells entwickelt. Dabei steht die Restaurierung des Limbus nicht im Vordergrund der Therapieziele. Die Bindehauttransplantation ist ein Verfahren, das von Thoft 1977 beschrieben wurde (Abbildung 2). Dabei wurden aus vier Quadranten des gesunden Partnerauges Bindehauttransplantate gewonnen und limbusnah auf dem limbusinsuffizienten Auge platziert. Diese Technik beruhte auf der Theorie der konjunktivalen Transdifferenzierung („conjunctival transdifferentiation“). Die Ergebnisse waren langfristig nicht zufriedenstellend und so wurde das Verfahren nicht weiter untersucht.

**Abbildung 2:** Konjunktivale Transplantation (Thoft 1977)

**A:** Die Transplantate werden von dem ipsilateralen gesunden Auge entnommen, von Stellen, die normalerweise durch die Augenlider bedeckt sind.

**B:** Platzierung der Bindehauttransplantaten.



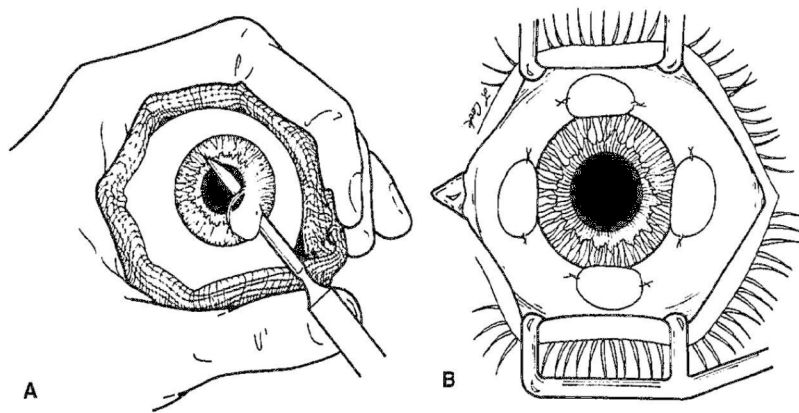
1984 beschrieb Thoft die erste homologe Transplantationstechnik zur Behandlung von schweren kornealen Oberflächenstörungen (Abbildung 3). Er nannte seine Methode Keratoepithelioplastik („keratoepithelioplasty“). Dabei wurden vier Lentikeln aus Hornhautepithel und einer dünnen darunterliegenden Stromaschicht aus der Hornhautperipherie von Spenderaugen abpräpariert. Sie wurden nachher zirkulär am korneoskleralen Limbus platziert und auf die Sklera genäht. Obwohl Thoft die gleichzeitige Transplantation von Limbus nicht beschrieb, da es noch keine

ausreichende Nachweise in Sinne des Stammzellmodells gab, ist es möglich, dass durch diese Methode einige Limbusstammzellen mit den Hornhauttransplantaten übertragen wurden.

**Abbildung 3:** Keratoepithelioplastik (Thoft 1984)

**A:** Gewinnung der lamellären Hornhautlenticeln aus dem Spenderbulbus

**B:** Aufnähung der Hornhautlenticeln um den korneoskleralen Limbus.



### 1.5.1 Therapie der partiellen Limbusinsuffizienz

Bei einer partiellen Limbusinsuffizienz kommt es durch eine lokalisierte Störung der Limbusstammzellen zu einem in der Regel segmental begrenzten Einwachsen von Bindehaut. Dua et al (1994) präsentierten in einer Studie eine therapeutische Strategie basierend auf der Erforschung der Reepithelialisierungskinetik der Hornhautoberfläche nach Beeinträchtigung des Limbus. Ihre Therapie beinhaltet die Entfernung eines kornealen Pannus konjunktivaler Herkunft, das Abkratzen aller Stellen konjunktivaler Proliferationen, die den Limbus überwinden und die Hornhaut bedrohen (Dua 1998). Bei allen Patienten, bei denen eine Reepithelialisierung der abpräparierten Zonen stattfand, konnte gleichzeitig eine Visusverbesserung festgestellt werden (Gatinel 2000).

Diese Methode stellt bei manchen Patienten möglicherweise eine interessante Alternative zur Limbustransplantation dar.

Trotz der oben genannten Intervention entwickelten viele Patienten eine progrediente Limbusstammzellinsuffizienz mit daraus resultierender sektorieller Vaskularisation und Oberflächenproblemen. Dafür stehen gegenwärtig drei unterschiedliche Therapieschemata zur Verfügung.

Ein erstes mögliches Verfahren ist die Amnionmembrantransplantation (Kruse und Meller 2001): sie begünstigt die Reepithelialisierung der Hornhautoberfläche. Die Amnionmembran wird direkt auf der zerstörten Hornhautoberfläche eingesetzt, hemmt die inflammatorischen Reaktionen und unterstützt die Reepithelialisierung. Ihre Basalmembran erleichtert die epitheliale Migration (Terranova 1986), die Adhäsion der epithelialen Basalzellen (Khodadoust 1968, Sonnenberg 1991) und den Ausdruck des epithelialen Phänotypus (Guo 1989, Streuli 1991, Kurpakus MA 1992). Die Amnionmembran besitzt des Weiteren antiapoptotische Eigenschaften (Boudreau 1995). Allerdings funktioniert diese Technik nur bei partieller Limbusstammzellinsuffizienz.

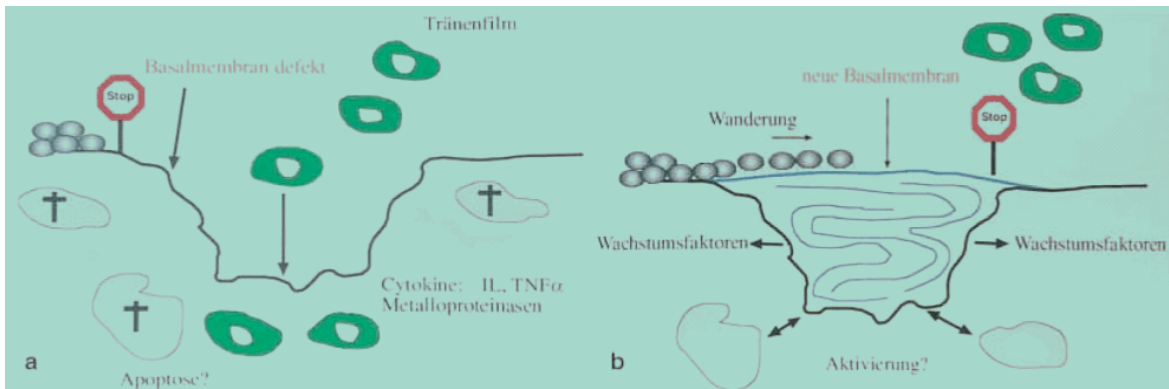
Zweitens die autologe Limbusstammzelltransplantation bei unilateraler und die homologe Limbusstammzelltransplantation bei bilateraler Limbusinsuffizienz: das chirurgische Verfahren und die Ergebnisse dieser Techniken werden im Folgenden beschrieben.

Eine dritte Therapiemöglichkeit der Limbusinsuffizienz ist die Transplantation ex vivo expandierter Limbusstammzellen (Meller und Kruse 2001).

#### **Abbildung 4:** Schema der Wirkungsweise der Amnionmembrantransplantation

- a) Schematische Darstellung der Situation bei Epitheldefekt mit Hornhautulkus:** Die Wanderung des Hornhautepithels ist bei fehlender Basalmembran und entzündlicher Infiltration der Hornhaut mit Verlust von Keratozyten und Ausschüttung entzündlicher Mediatoren (IL: Interleukine, TNF-A: Tumor Nekrose Faktor-alpha) nicht möglich.
- b) Zustand nach Amnionmembrantransplantation:** Die neue Basalmembran ermöglicht Epithelverschluss durch Migration. Der Einstrom von Entzündungszellen ist signifikant reduziert. Die Amnionmembran setzt lösliche Wachstumsfaktoren frei und moduliert durch intrinsische antiinflammatorische Eigenschaften stromale Keratozyten und Hornhautepithelzellen.

**Abbildung 4**



### 1.5.2 Therapie der totalen Limbusinsuffizienz

Die Amniontransplantation eignet sich zur Rehabilitation von Patienten mit partieller Limbusinsuffizienz. Bei schwerer Limbusinsuffizienz wird eine andere therapeutische Technik benötigt, nämlich die Transplantation von Limbusstammzellen. Nach einer konventionellen Keratoplastik müssen die Limbusstammzellen des Wirtes das Spenderepithel des Transplantates innerhalb der ersten 12 bis 18 postoperativen Monate vollständig ersetzen (Hanna C, Irvin ES 1962). Augen mit schweren Limbusstammzellschäden können daher nur rehabilitiert werden, wenn zusätzlich zur perforierenden Keratoplastik Limbusstammzellen mittransplantiert werden (Chen 1990, Huang 1991, Kruse 1996, Kruse 2001, Reinhard 1999, Sundmacher 1996, Sundmacher 1997).

#### 1.5.2.1 Autologe Limbustransplantation

Kenyon und Tseng haben 1989 - inspiriert von den Arbeiten von Thoft (1984) und den Erfahrungen von Davanger und Schermer (1986) - eine Technik der konjunktivolimbale Transplantation vorgestellt (Abbildung 5). Bei dieser Technik wurde konjunktivales und limbales Gewebe vom normalen Partnerauge zur Behandlung einer diffusen Limbusstammzellinsuffizienz bei unilateralen Oberflächenstörungen oder einer fokalen Limbusstammzellinsuffizienz bei unilateralen oder bilateralen Oberflächenstörungen benutzt.



Die Vorbereitung des betroffenen Auges beinhaltet die Peritomie und Rückpräparation der Bindehaut 2mm hinter dem Limbus sowie die Entfernung des fibrovaskulären Pannus. Die Größe des Transplantates wird von der Ausdehnung des Defizites bestimmt, in der Kenntnis, dass eine vollständige Abdeckung der verletzten Zone nicht notwendig ist. Doch sollte darauf geachtet werden, dass eine Intervention am Limbus die Gefahr der Induktion einer iatrogenen Limbusinsuffizienz beinhaltet. Die Häufigkeit des Auftretens von Komplikationen im gesunden Spenderauge ist der Ausdehnung der Gewebeentnahme proportional. In einem gesunden Auge ist das Risiko gering, wenn das Transplantat ein Drittel der Zirkumferenz des Limbus nicht überschreitet (Holland 1996). Andere Autoren haben am Auge des Kaninchens gezeigt, dass beim Gewinn von zwei Dritteln der Limbusperipherie eine partielle Limbusinsuffizienz auftreten kann (Cheng 1990, Cheng 1991). Kenyon und Tseng (1989) schlagen die Entnahme von 2 Transplantaten mit einer Ausdehnung von jeweils 3 Uhrzeiten vor, die 0,5 mm klare Hornhaut enthalten. Rao (1999) empfiehlt eine Transplantatgewinnung durch die Präparation einer Bindehautschürze bis in die vaskuläre Limbusarkade und verzichtet auf die Entnahme von Hornhautstroma. Diese Variante eignet sich möglicherweise im Falle eines erhöhten Risikos von induzierter Limbusinsuffizienz am Spenderauge.

**Abbildung 5:** Konjunktivolimbale Transplantation (Kenyon und Tseng 1989)

**A:** Die Vorbereitung des betroffenen Auges (Empfängerauge) beinhaltet die Peritomie und Rückpräparation der Bindehaut 2 mm hinter dem Limbus.

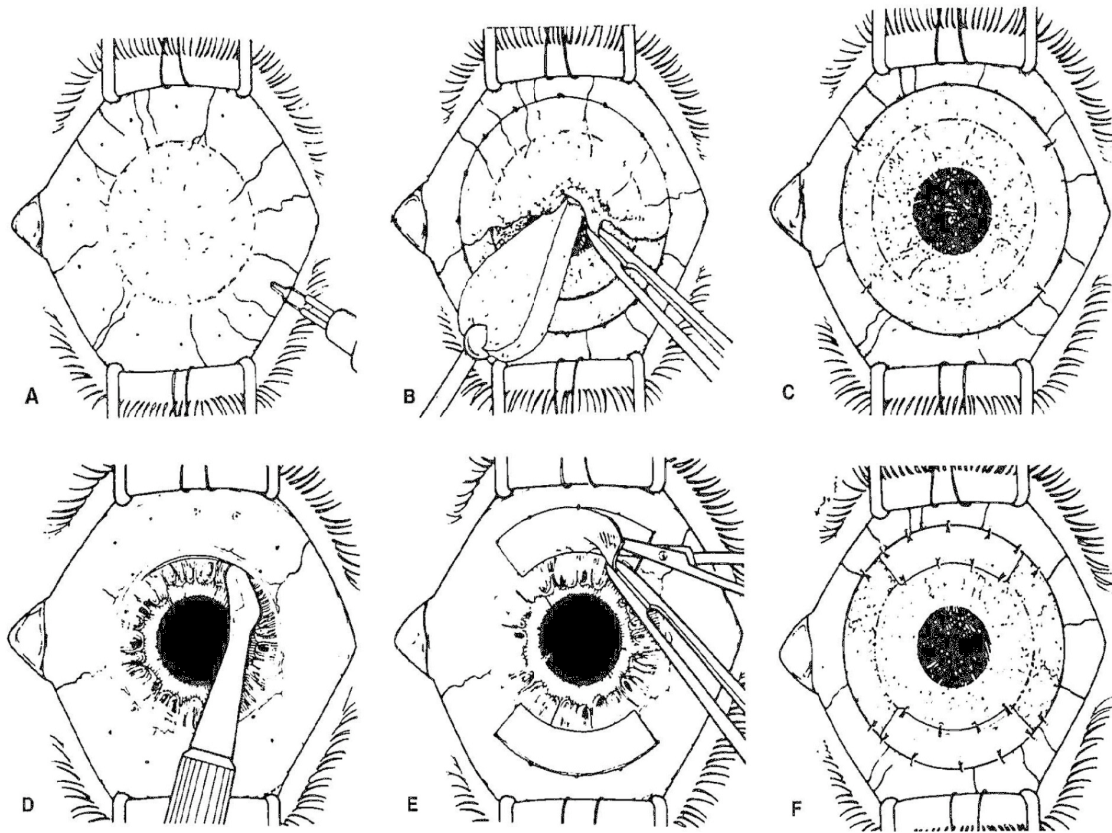
**B:** Pathologische Hornhautepithel und fibrovaskulärer Pannus des Empfängerauges werden abgetragen.

**C:** Zusätzliche Politur der Empfängerhornhaut glättet die Hornhautoberfläche, um die optische Abbildungsqualität zu verbessern.

**D:** Superiores und inferiores Linbus-Transplantat vom Spenderauge werden präpariert.

**E:** Konjunktivaler Anteil des Transplantates wird am Spenderauge festgelegt und von seiner limbalen Umgebung dünn abgetrennt.

**F:** Die Limbustransplantate werden zu den vorbestimmten Stellen des Empfängerauges fixiert.

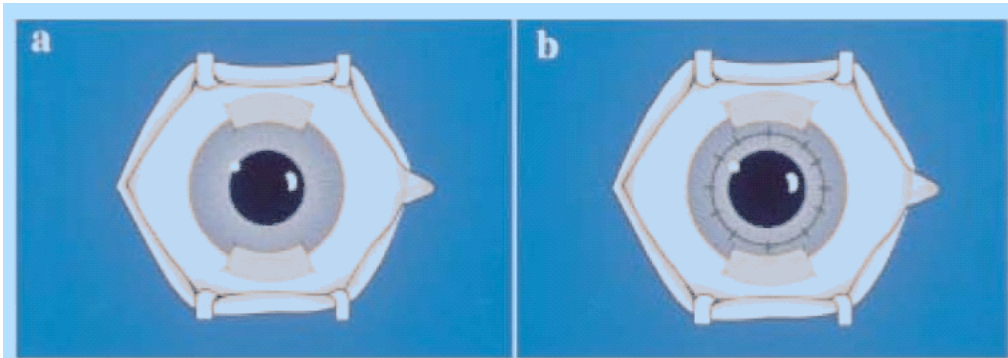


Häufigste Indikation für eine autologe Limbusstammzelltransplantation stellt die sekundäre unilaterale Limbusstammzellinsuffizienz nach Verätzung oder Verbrennung dar. Nach der Erstbeschreibung der Methode fanden mehrere Studien statt, welche die Effizienz des Verfahrens nachwiesen (Tsai 1990, Moldovan 1999, Dua 2000). Dua beschrieb 2000 eine Methode zur autologen Limbustransplantation, die bei 6 Patienten mit unilateraler Stammzellinsuffizienz durchgeführt wurde (Abbildung 6). Drei davon bekamen gleichzeitig oder danach eine perforierende Keratoplastik. Die Technik der Operation wird in der nächsten Abbildung dargestellt. Bei einer kurzen Nachbeobachtungszeit von 18 Monaten war bei allen Fällen eine stabile Oberflächenrekonstruktion der Hornhaut mit deutlichen Visusanstieg zu berichten.

**Abbildung 6:** Autologe Limbustransplantation nach Dua (2000)

**A:** Autologe Limbustransplantate werden bei 6 und 12° Position am Empfängergeraue fixiert. Die Transplantate enthalten 2 mm periphere Hornhaut, Limbus und 3 mm Bindehaut.

**B:** Autologe Limbustransplantation mit zusätzlicher perforierenden Keratoplastik.



Die Rekonstruktion der Epithelschicht der Hornhaut kann experimentell mit immunologischen Markierungstechniken durch Antikörper gegen spezifische Hornhautmarker demonstriert werden (Tsai 1990). Tsai et al (1990) haben die Ergebnisse der Limbustransplantation und Bindehauttransplantation im Kanninchenmodell bei schwerer Oberflächenstörung verglichen (Abbildung 7). Sie beschrieben eine signifikante Verminderung der Hornhautvaskularisation bei Limbustransplantation und im Gegensatz dazu eine Vermehrung der Vaskularisation bei Bindehauttransplantation. Ausschlaggebend war, dass durch Immunfluoreszenz-Analysen mit monoklonalen Antikörpern die entstandenen Epithelien einen kornealen Phänotyp bei Limbustransplantation zeigten. Sie blieben aber konjunktival bei Bindehauttransplantation. Das Ergebnis dieser Studie verstärkte das Konzept des Stammzellmodells. Die Erfolgsaussichten der Technik hängen neben dem okulären Befund ganz entscheidend von der Wahl des Operationszeitpunktes ab. Schlecht ist die Prognose bei stark entzündeten Augen in der Frühphase nach Verätzung, insbesondere bei tieferen Schäden. Dabei überleben Transplantate in der Akutphase bei avaskulärem Wirtslimbus mit totalem Epitheldefekt nicht (Rao 1999, Kruse 2001).

Die Anwendung der autologen Limbustransplantation kann auch bei der Rekonstruktion der Hornhautoberfläche bei Epitheliopathien durch inadäquate Kontaktlinsenbenutzung (Jenkins 1993), nach Entfernung von epidermoiden Karzinomen des Limbus (Copeland 1990) und von primären oder rezidivierenden Pterygia hilfreich sein (Adamis 1990, Shimazaki 1996).

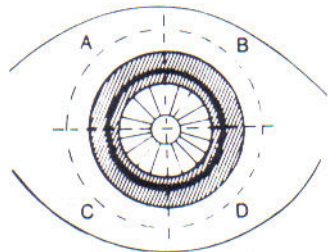
**Abbildung 7:** Studie von Tsai (1990) zum Vergleich der limbalen und konjunktivalen Transplantation im Kanninchen

**A:** Schematische Darstellung der entfernten limbalen Zone im Kanninchen inklusiv 2 mm der peripheren Hornhaut und 3 mm der perilimbale Konjunktiva

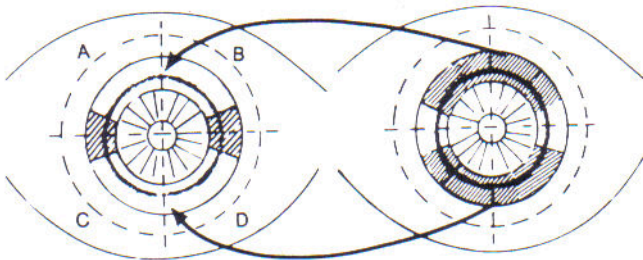
**B:** Technik der Limbustransplantation

**C:** Technik der Bindehauttransplantation

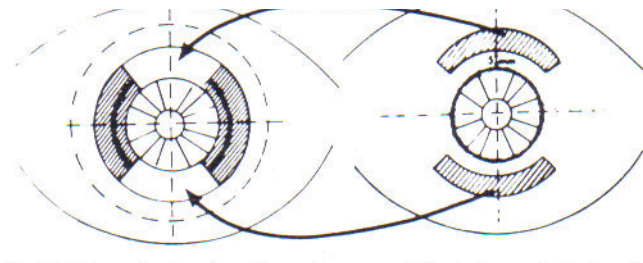
#### TOTALE ENTFERNUNG DES LIMBUS



#### LIMBALE TRANSPLANTATION



#### KONJUNKTIVALE TRANSPLANTATION



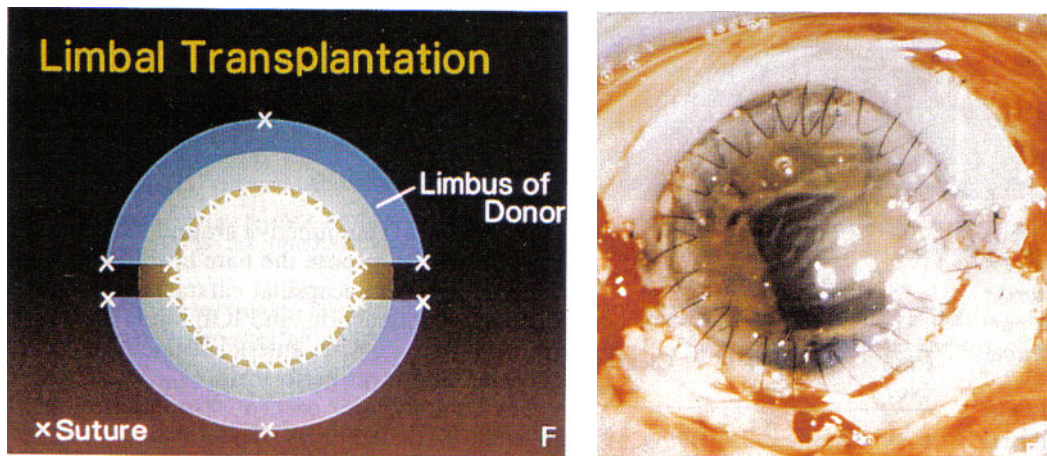
#### 1.5.2.2 Homologe Limbustransplantation

Weder bei primärer Limbusinsuffizienz noch bei bilateralem sekundären Stammzellschaden (Verbrennungen, Verätzungen, Stevens-Johnson Syndrom, Lyell Syndrom) kann eine autologe Transplantation durchgeführt werden. Derartige Patienten bedürfen einer Transplantation von Fremdgewebe und sind mit erheblichen immunologischen Problemen konfrontiert. Das

chirurgische Prinzip ist der autologen Transplantation ähnlich. Es handelt sich um eine Variante der Keratoepithelioplastik, wie sie Thoft beschreibt (1984). Dabei werden von einem Spenderbulbus vier ovale, lamelläre Lentikel präpariert, die peripheres Hornhautepithel und darunterliegendes Stroma enthalten.

Die erste homologe Limbustransplantation wurde von Tsai und Tseng (1994) beschrieben. Der durch Trepanation gewonnene Ring wurde nach lamellärer Präparation und Teilung in drei gleiche Stücke auf dem Limbus des betroffenen Auges verankert. Tsubota und Mitarbeiter (1995) modifizierten diese Technik (Abbildung 8). Sie verwendeten kurzzeitig kultivierte Korneoskleralscheibchen, deren Dicke durch anschließende lamelläre Präparation von der Rückseite des Ringes reduziert wurde. Der nunmehr aus einem lamellären Transplantat bestehende Ring wurde in zwei 180° umfassende Segmente unterteilt und dann wurden diese am Limbus verankert. Das Operationsverfahren wurde von den Autoren als Limbustransplantation (allograft limbal transplantation) bezeichnet.

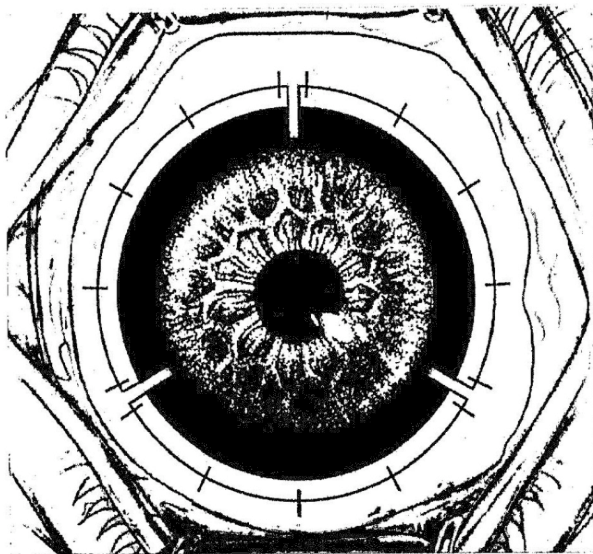
**Abbildung 8:** Verfahren der Limbustransplantation nach Tsubota (1995)  
(allograft limbal transplantation).



Holland und Mitarbeiter schlugen 1996 ihre Variante vor, mit der sie eine Erhöhung der Menge der transplantierten Stammzellen anstrebten (Abbildung 9). Dabei wurden wiederum lamelläre Ringpräparate gewonnen und in zwei Hälften geteilt. Von den vier Hälften aus zwei

korneoskleralen Ringen wurden drei auf dem Empfängerauge fixiert. Somit war die gesamte Limbuszirkumferenz bedeckt und die Menge der transplantierten Stammzellen im Vergleich zu einem einzelnen Spenderauge anderthalb mal mehr erhöht. Die Methode wird von den Autoren als keratolimbal Transplantation (keratolimbale allograft oder KLAT) bezeichnet.

**Abbildung 9:** Schematische Darstellung eines Empfängerauges nach keratolimbaler Transplantation wie beschrieben von Holland 1996



Tsai 1994 berichtete von ausgezeichneten Ergebnissen der homologen Limbustransplantation mit totaler Regression der Gefäße bei zwei Drittel der Fälle und partieller Regression der Gefäße bei den übrigen Fällen. Die bis dahin üblichen Therapieformen führten bei fast allen Patienten zu Rezidiven der Limbusinsuffizienz. Zahlreiche weitere Studien wurden mittlerweile mit ähnlichen zufrieden stellenden Ergebnissen durchgeführt. Sie hatten als Merkmal ein kleines heterogenes Krankengut und eine kurze postoperative Beobachtungszeit (Coster 1995, Dua 1999, Holland 2000, Tan 1996, Tsubota 1995, Tsubota 1996, Tsubota 1999). Besondere Beachtung verdient die Leistung von Tsubota und Mitarbeitern 1999. In ihrer Langzeitstudie wurden 22 von 43 Augen mit einem mittleren Nachbeobachtungszeitraum von vier Jahren erfolgreich behandelt. Obwohl es sich um schwere Formen der Limbusinsuffizienz handelte, wurden die Ergebnisse durch Modifikation der Operationstechnik, die die Verwendung von Amnionmembranen in

Kombination mit der Stammzelltransplantation beinhaltet, deutlich verbessert. Die zusätzliche Verabreichung von Serum Augentropfen, die Behandlung mit Tarsoraphie und eine engmaschige Nachkontrolle führten ebenfalls zur bemerkenswerten Optimierung der Ergebnisse.

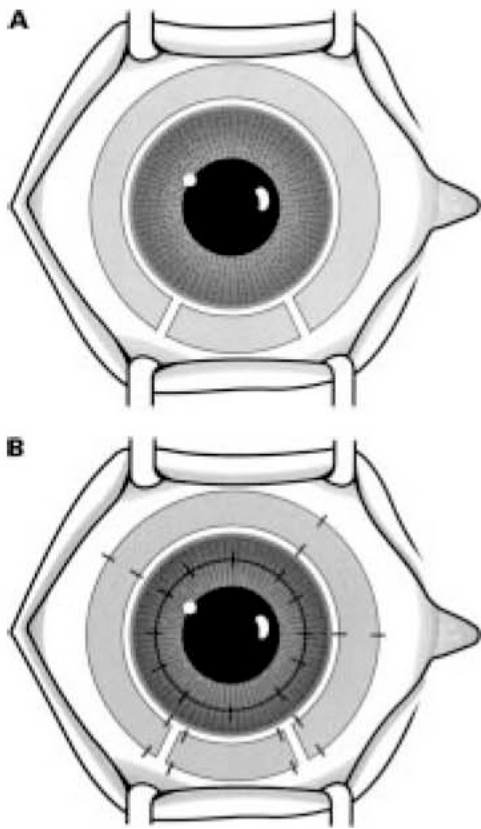
Dua präsentierte 1999 sein eigenes Verfahren der Limbustransplantation für die Behandlung bilateraler Oberflächenstörungen (Abbildung 10). Zunächst wurde eine zirkuläre lamelläre Dissektion der peripheren Hornhaut des Spenders mit Einbeziehung von 1 bis 2 mm konjunktivalen Gewebes durchgeführt. So entstand ein offener Ring bestehend aus peripherem Hornhaut-, Limbusepithel und Bindehaut mit oberflächlichem Hornhaut-, Limbus- und Sklerastroma. Am Empfängerauge wurde eine 360° Peritomie und anschließend eine Abtragung des oberflächlichen fibrovaskulären Gewebes durchgeführt. Der offene Transplantatring wurde am Rande des Empfängerlimbus fixiert. Die offene Stelle zwischen den Enden des Ringes wurde mit einem anderen Transplantat aus dem Partnerauge des gleichen Spenders ausgefüllt. Von 6 Patienten, die in dieser Studie teilnahmen, zeigten 5 in einer kurzen postoperativen Beobachtungszeit von 3 bis zu 24 Monaten einen Befund mit Sehverbesserung und stabile Epithelialisierung der Hornhautoberfläche. Die Patienten bekamen zur Immunsuppression systemisch FK-506 und nur einer entwickelte eine Abstoßungsreaktion gegen den Limbus.

**Abbildung 10:** Homologe Limbustransplantation nach Dua (1999)

**A:** Der transplantierte Ring, der Limbusstammzellen enthält, wird um den Limbus des Empfängers fixiert. Ein kleiner Bogen des gleichen Gewebes füllt die Spalte zwischen beiden Rändern des Ringes.

**B:** In dieser Zeichnung wird auch eine zentrale perforierende Keratoplastik dargestellt.

**Abbildung 10**



### **1.5.2.3 Homologe zentrale Limbo-Keratoplastik**

Soll eine Kombination einer perforierenden Keratoplastik mit einer Limbustransplantation durchgeführt werden, so stehen 4 verschiedene Vorgehensweisen zur Verfügung (Abbildung 11a und 11b).

- a) die Durchführung zunächst der Limbustransplantation und danach der perforierenden Keratoplastik, entweder ein- oder zweiseitig.
- b) die Verwendung übergroßer Transplantate
- c) die Durchführung einer Limbo-Keratoplastik (homologe zentrale Limbo-Keratoplastik)
- d) in den letzten Jahren erzielte Fortschritte in der Zellbiologie erlauben die Kultur kornealer Stammzellen vom Menschen im Rahmen eines Tissue-engineering (Meller, Kruse 2001).



Die ersten beiden Möglichkeiten gehen mit der Notwendigkeit einher, im Bindehaut- und Limbusbereich des Empfängers zu präparieren, sind mit potentiell schwerwiegenden immunologischen Komplikationen verbunden und sind technisch sehr aufwendig. Bei der erstgenannten Methode wird die immunologische Situation durch ein ggf. zweizeitiges Vorgehen und die Verwendung von Gewebe zweier unterschiedlicher Spender stark verschlechtert. Die Verwendung übergroßer Transplantate birgt die Gefahr einer Alteration des Trabekelwerkes mit nachfolgendem schwer beherrschbarem Glaukom (Kruse 2001).

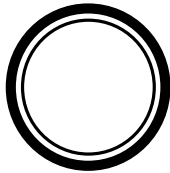
Aus diesen Gründen wurde die minimal traumatische, technisch einfache und immunologisch potentiell günstigere Variante der homologen perforierenden zentralen Limbo-Keratoplastik entwickelt. Die Technik der Methode wird detailliert im Kapitel 2.3.1 beschrieben. Sie wird seit 1993 klinisch erprobt. Sundmacher, Reinhard und Mitarbeiter zeigen seit 1997 in verschiedenen Studien, dass die zentrale Limbo-Keratoplastik ein wertvolles, zukunftsträchtiges Verfahren ist. In ihrer Studie blieben 4 von 18 Transplantaten nach durchschnittlich 22 Monaten Nachbeobachtungszeit klar, die anderen 14 Transplantate trübten ein. Ursachen waren 7 mal schwere Oberflächenstörungen, 5 mal schwere Oberflächenstörungen in Kombination mit endothelialen Immunreaktionen und 2 mal nur endotheliale Immunreaktionen. Die nicht ganz befriedigenden Ergebnisse sind auf die Immundestruktion des Limbus zurückzuführen (Sundmacher 1997). In einer anderen retrospektiven Studie trübten 7 von 25 Transplantaten ein. Die Hauptursache der kleinen Erfolgsquote war ebenfalls die hochgradig immunogene Wirkung des Limbus (Reinhard 1999).

Eine weitere Modifikation der homologen Limbustransplantation ist die homologe lamelläre Limbo-Keratoplastik (Sundmacher 1998). Sie ist beim Fehlen von Hornhauttrübungen im hinteren Stroma indiziert. Im Vergleich zur perforierenden zentralen Limbo-Keratoplastik hat sie möglicherweise optische Nachteile, aber den großen Vorteil, dass endotheliale Immunreaktionen nicht auftreten. Sie ist bei Patienten mit limitierter Visusprognose indiziert, wie beispielsweise bei kongenitaler Aniridie.

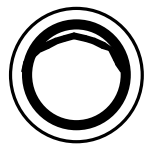
**Abbildung 11a:** Schematische Darstellung verschiedener Kombinationsmöglichkeiten von Limbustransplantation und perforierender Keratoplastik



a) Lamelläre  
Limbustransplante  
kombiniert mit  
konventioneller  
Keratoplastik



b) Übergroße Limbo-  
Keratoplastik

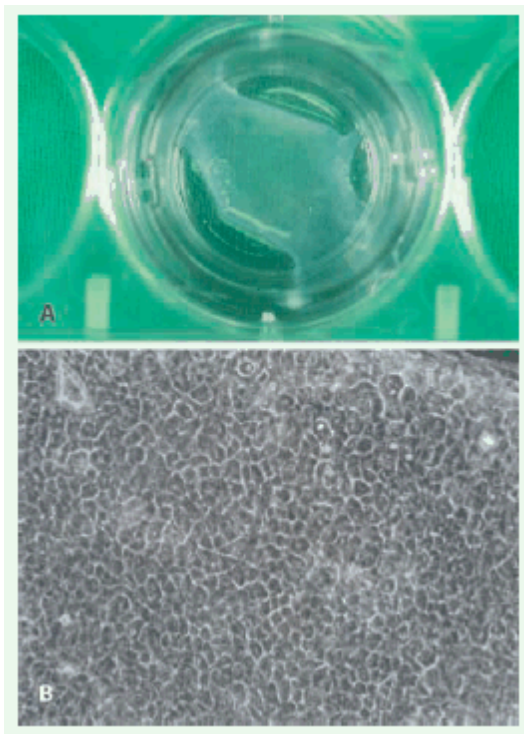


c) Exzentrische Limbo-  
Keratoplastik

**Abbildung 11b:** Ex vivo Expansion humaner Limbusepithelzellen (Meller, Kruse, 2001)

A. Kultur der Limbusepithelzellen auf Amnionmembran in einem speziellen Kultureinsatz (Insert).

B. Phasenkontrastaufnahme von Limbusepithelzellen auf Amnionmembran nach ex vivo Expansion. Die Epithelzellen sind typischerweise klein, uniform und kompakt organisiert.



## **1.6 Tripel-Operation**

Bei gleichzeitiger Indikationsstellung einer Keratoplastik und einer Kataraktoperation wird heutzutage oft die kombinierte ophthalmochirurgische Vorgehensweise einer Tripel-Operation bevorzugt. Als Tripel-Operation wird ein aus drei Teilen bestehendes einzeitiges ophthalmochirurgisches Vorgehen bezeichnet, das eine perforierende Keratoplastik, eine extrakapsuläre Kataraktextraktion (ECCE) und die Implantation einer intraokularen Linse (IOL), meist einer Hinterkammerlinse, umfasst. Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen guten Ergebnisse des klaren Transplantatüberlebens nach einer Tripel-Operation mit denen einer zweizeitig organisierten Operation, so gewinnt die Tripel-Operation durch verkürzte postoperative Zeit bis zur Ausbildung eines guten Visus immer mehr an Bedeutung (Hunkeler 1979, Lindstrom 1981, Binder 1985, Crawford 1986, Busin 1987, Kirkness 1987, Skorpik 1988, Dangel 1994). Ob jedoch die Tripel-Operation im Vergleich zur einfachen Keratoplastik einer erhöhten Gefahr eines Transplantatversagens oder einer Immunreaktion ausgesetzt ist, wurde bislang nicht eindeutig geklärt. Die Arbeit von Böhringer 2004, die sich mit diesem Thema befasst, ergibt, dass die Tripel-Operation kein spätes Transplantatversagen zu fördern scheint. Die Patienten der Studie wurden in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Kataraktoperation relativ zur perforierenden Keratoplastik in vier Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe waren die Patienten im Zeitpunkt der Keratoplastik schon pseudophak, in der zweiten bekamen sie eine Tripel-Operation, in der dritten wurde eine Kataraktoperation nach der Keratoplastik durchgeführt und in der letzten Gruppe wurden die Patienten phak belassen. Zwischen den Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Es scheint, dass eine Katarakt-Operation -wird sie simultan (Tripel-Operation), mit der Keratoplastik, oder nach der Keratoplastik durchgeführt- ein spätes Transplantatversagen nicht fördert.

## **1.7 Hornhauttransplantate**

### **1.7.1 Ausschlusskriterien für die Hornhautspende**

Nach den Richtlinien zum Führen einer Hornhautbank , die auf dem am 01.11.1997 in Kraft getretenen Transplantationsgesetz beruhen und den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft

Deutscher Hornhautbanken entsprechen, sollte jedes erkennbare Infektionsrisiko vermieden werden.

Absolut auszuschließen als Hornhautspender sind Personen mit einer positiven Serologie für das Hepatitis-B-Virus-Antigen ( HbsAg ), Hepatitis-C-Virus-Antikörper ( Anti-HCV ), Hepatitis-C-Virus-RNA und HIV-1/2-Antikörper sowie Personen, deren Risiko für eine HBV-, HCV- oder HIV-Infektion im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht ist, wie zum Beispiel weibliche und männliche Prostituierte, parenteral drogenabhängige, Personen, die aus Ländern mit weiter Verbreitung der oben erwähnten Erkrankungen kommen oder denen regelmäßig Blut transfundiert wurde oder die regelmäßig hämodialysiert wurden.

Personen, denen menschliche Hypophysenhormone, wie zum Beispiel das Wachstumshormon Somatostatin oder Dura mater verabreicht wurden oder denen eine Kornea transplantiert wurde, scheidern als Spender aus.

Klinisch manifeste Infektionen mit manchen Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten gelten als Ausschlußkriterien.

Beispiele für solche bakteriellen Infektionen sind Typhus abdominalis, Leptospirosen, Borreliosen, Brucellosen, Syphilis, Tuberkulose, Rickettsiosen und Tularämie. Beispiele für derartige virale Infektionen sind Masern, Röteln, Varicella-Zoster, Meningitis, Enzephalitis und Rabies.

Lebendimpfungen gegen Röteln, Masern, Mumps, Poliomyelitis oder Gelbfieber vier Wochen vor einer Hornhautexplantation oder eine bis zu zwölf Monate zurückliegende postexpositionelle Tollwutimpfung machen eine Spende unmöglich.

Als Beispiele für parasitäre Infektionen seien Malaria, Toxoplasmose, Trypanosomiasis und Leishmaniasis genannt.

Eine Sepsis mit Methicillin oder Vancomycin resistentem Staphylococcus aureus oder mit Pilzen verbietet eine Hornhautspende.

Zentralnervöse Erkrankungen unklarer Genese wie Multiple Sklerose, amyotrophe Lateralsklerose, M. Alzheimer und die durch Prionen ausgelöste Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung schließen eine Spende aus.

Auch Lokalinfektionen des Spenderauges, zum Beispiel mit Pneumokokken, Chlamydien, Neisserien, Treponemen, Mycobacterium tuberculosis oder mit Adeno-, Herpes- oder Cytomegalie-Viren oder auch Pilzen verhindern eine Hornhautspende.

Die Transplantate werden nach erfolgter Entnahme mit der Spaltlampe auf Narben, die ein weiteres Ausschlusskriterium darstellen, untersucht. Im nächsten Schritt wird unter dem Spiegel- und Phasenkontrastmikroskop das Transplantatendothel evaluiert. Bei guter Endothelzellichte und homogenem Endothelzellmuster gibt es für das Spenderalter keine Obergrenze. Liegt jedoch die Endothelzellichte unter 2000 Zellen/mm<sup>2</sup>, oder liegt eine höhergradige Pleomorphie vor, so sollte die Spenderhornhaut nicht transplantiert werden.

### **1.7.2 Gewebetypisierung (HLA-Matching)**

Als primäre Stimuli der Allograftreaktion werden HLA-Antigene (Human Leukocyte Antigen) angenommen. Dies sind individualspezifische Membranantigene, die für die biologische Integrität und die immunologische Überwachung des gesamten Organismus entscheidend sind. Die genetische Information für diese Antigene ist für den Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert und umfasst etwa 3,5 Mio. Basenpaare. Dieser extreme Polymorphismus weist bereits auf das Problem eines optimalen HLA-Matchings von Spender- und Empfängerereigenschaften hin (Pleyer 1997). Innerhalb der HLA Antigene werden HLA-Klasse I und Klasse II Antigene unterschieden. Während HLA-Klasse I Antigene auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, können HLA-Klasse II Antigene nur an Zellmembranen spezifischer immunkompetenter Zellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Giles 1985). Eine differenzierte Verteilung der HLA Antigene kann auch in der Hornhaut nachgewiesen werden und ist für die Immunreaktion von großer Bedeutung. HLA-Klasse I Antigene konnten insbesondere in Korneaepithel und in deutlich geringerer Dichte im Stroma und Endothel nachgewiesen werden (Fujikawa 1982, Mayer 1983, Whitsett 1984). HLA-Klasse II Antigene werden dagegen stärker fokal exprimiert. Sie konnten dort nur vereinzelt im Hornhautepithel, und hier insbesondere in der Limbusregion sowie im Hornhautstroma nachgewiesen werden (Chandler 1985, Fujikawa 1982, Mayer 1983, Pepose 1985, Treseler 1984).

Die Expression von Histokompatibilitätsantigenen kann deutlich moduliert werden. So ist allein durch das operative Trauma nach perforierender Keratoplastik eine verstärkte Neuexpression von HLA-Klasse II Antigen im Korneaepithel nachweisbar (Peeler 1986). Nach entzündlichen Prozessen und erfolgter Allograftreaktion kann, insbesondere unter Vermittlung von gamma-

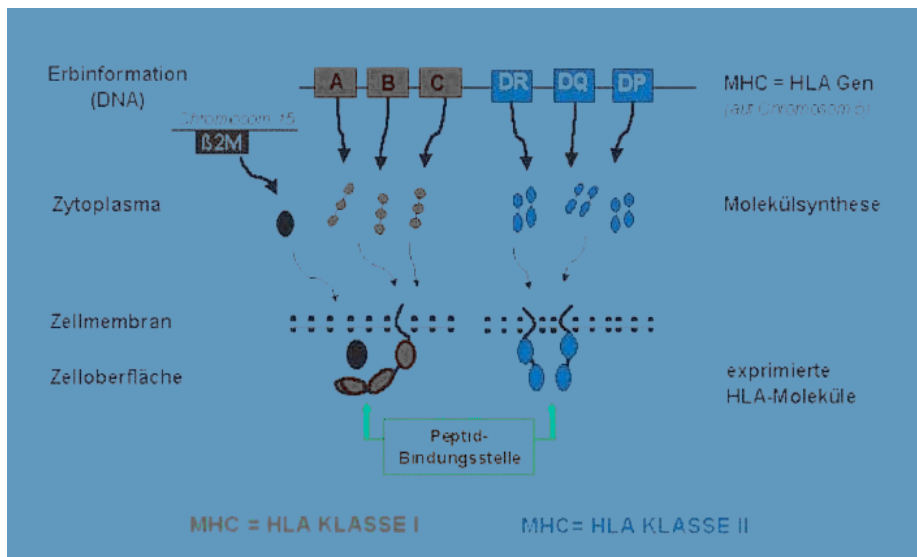
IFN, eine Neuexpression von HLA-Klasse II Antigenen erfolgen (Donnelly 1985, Iwata 1992, Young 1985, Pepose 1985).

Es bestehen verschiedene Probleme bei der HLA-Typisierung. Erstens sind die molekulargenetischen Methoden, welche eine signifikant große Präzision gewährleisten, nur in spezialisierten Zentren verfügbar. Durch die Organkultur der Hornhaut über 1-3 Wochen geht die Epithelschicht mit der Folge des Untergangs von HLA-Klasse II positiven Langerhanszellen (Holland 1987) unter. Diese verminderte Antigenexpression kann einerseits in Hinblick auf Immunreaktionen vorteilhaft sein, andererseits ist ein gegenteiliger Effekt mit deutlicher Steigerung der Expression von HLA-Antigenen durch Entzündungsmediatoren, z.B gamma-Interferon möglich. In der Organkultur findet ein Nachwachsen der Epithelzellen in 1-2 Schichten statt. Bei besonders schweren Oberflächenproblemen ist eine intakte Epithelschicht sehr wichtig, um die kritische postoperative Frühphase zu überstehen, in der persistierende Hornhauterosionen das Transplantatüberleben fatal beeinflussen können.

Es existieren Hinweise, dass der Endothelzellverlust bei einem guten HLA-Match kleiner ausfällt als bei einem schlechten (Reinhard 2000). Der idiopathische Endothelzellverlust ist definiert als ein bislang unerklärtes Absinken der Endothelzellichte perforierender Hornhauttransplantate. Dieses Phänomen, dem möglicherweise eine subklinisch verlaufende Immunreaktion zugrunde liegt (Ruusuvaara 1979, Böhringer 2001), begrenzt langfristig das Überleben der meisten Transplantate. In einer Studie von Reinhard (2004) wird der Zusammenhang zwischen HLA-Matching und Endothelzellverlust analysiert. Im Gegensatz zu den primären Erwartungen ergab die Studie einen ähnlichen Endothelzellverlust der Transplantate, unabhängig davon, ob sie gut oder schlecht gematcht waren. Die Studie hat als Schlußfolgerung dass, das HLA-Matching einen ineffektiven Parameter zur Senkung des chronischen Endothelzellverlustes darstellt. Daraus ergibt sich trotzdem nicht, dass der chronische Endothelzellverlust nach einer perforierenden Hornhauttransplantation ein nichtimmunologisches Phänomen ist. Es könnte darauf hinweisen, dass die aktuellen Methoden zum HLA-Matching nicht genug sensitiv oder spezifisch sind um den chronisch progressiven Endothelzellverlust zu beeinflussen.

**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Gene des HLA-Komplexes und der strukturellen Unterschiede der HLA-Klassen I und II (Wachtlin 2003).

Die auf dem Chromosom 6 lokalisierten HLA-Gene kodieren u.a. für die Moleküle der HLA-Klasse I (A, B, C) und II (DR, DQ, DP). Eine Ausnahme bildet das sog.  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-M), das als integraler Bestandteil der HLA-Klasse-I-Moleküle von Genen kodiert wird, die auf dem Chromosom 15 lokalisiert sind. Nach der Molekülsynthese werden die verschiedenen HLA-Moleküle durch die Zellmembran geschleust und auf der Zelloberfläche exprimiert. Dort haben sie die Funktion, antigene Peptidfragmente den für die jeweilige HLA-Klasse spezifischen T-Lymphozyten zu präsentieren.



## 1.8 Immunsuppression

Es ist bekannt dass Allograftreaktionen nach Keratoplastik zu 90% innerhalb des ersten Jahres postoperativ auftreten (Pleyer 1990). Danach ist eine Reaktion gegen das transplantierte Gewebe seltener zu beobachten. Die Transplantation von HLA-exprimierendem Limbusgewebe mit vielen Langerhans-Zellen in das vaskularisierte Bett des Empfänger Auges bedingt ein sehr hohes Risiko von Abstoßungsreaktionen und macht damit eine Immunsuppression notwendig. Die einzelnen immunsuppressiven Medikamente werden im Folgenden beschrieben.

### 1.8.1 Steroide

Das Risiko eines immunologisch bedingten Transplantatversagens konnte durch verschiedene immunsuppressive Maßnahmen erheblich gesenkt werden. Als Basisimmunsuppression werden in der frühen postoperativen Phase hochdosierte systemische Kortikosteroide verabreicht. Diese wirken relativ unspezifisch immunsuppressiv und antiphlogistisch durch Hemmung der Leukozytenmigration über eine Hemmung der Mediatorsynthese und durch Modulation von Effektorzellen. Aufgrund der zahlreichen systemischen Nebenwirkungen ist jedoch nur eine relativ kurzfristige hochdosierte Therapie möglich. Die systemische Verabreichung von Steroiden kann zu erheblichen systemischen Nebenwirkungen wie Blutzuckerentgleisung, gastrointestinale Beschwerden, Infektionen, innere Unruhe und selten psychotische Reaktionen führen (Küttler 1996).

Seit etwa 40 Jahren ist die lokale Steroidtherapie nach perforierender Keratoplastik eine effektive Prophylaxe gegenüber Immunreaktionen (Reinhard 1997). Laut Sundmacher et al. (1983) sollen lokale Steroide in einer Dosierung von 3-5 Tropfen täglich eine effektive Prophylaxe nach Keratoplastik darstellen. Die Vorteile des Einsatzes von lokalen Kortikosteroiden liegen neben der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung, den vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften (sehr gute Permeabilität für die Zellmembran). Die Nebenwirkungen der lokalen Applikation von Steroiden betreffen eine verzögerte stromale Wundheilung der Kornea, vor allem nach perforierender Keratoplastik durch Inhibierung von Fibroblasten und reduzierter Kollagensynthese, eine erhöhte Infektgefahr, die Reaktivierung einer Herpeskeratitis, das Sekundärglaukom (Steroid-Response-Glaukom) und die subkapsuläre Kataraktbildung. Außerdem ist die Inhibierung der Zytokinsynthese durch die Kortikosteroide rasch reversibel und es kann bei Abbruch der Steroidtherapie zu Reboundeffekten kommen. (Pleyer 2003). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Therapie ausschleichend beendet werden sollte.

Inwiefern neben einer lokalen Steroidtherapie eine zusätzliche systemische Steroid-Applikation erforderlich ist, ist bisher nicht genau geklärt. In der Studie von Mayweg et al. (2005) bestand kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des klaren Transplantatüberlebens und der Anzahl von Immunreaktionen zwischen Gruppen mit oder ohne systemische Steroidtherapie. Diese Beobachtung betrifft die Normalrisiko-Keratoplastik.



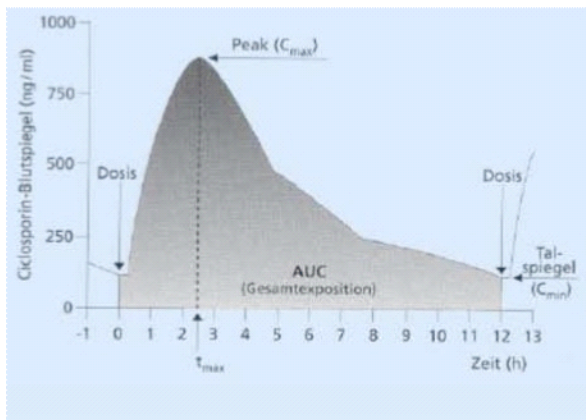
### 1.8.2 Cyclosporin A

Seit Mitte der 80er-Jahre wird das Makrolid Antibiotikum Cyclosporin A (CsA) zur systemischen Immunsuppression nach Hochrisikokeratoplastiken erfolgreich eingesetzt. CsA wirkt hauptsächlich durch die Hemmung der Interleukin-2 Synthese in aktivierten T-Lymphozyten (Abbildung 14). Interleukin-2 ist der Hauptmediator der Abstoßungsreaktion. Durch den Einsatz von systemischem CsA nach Hochrisikokeratoplastiken konnte die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen auf 7-30% gesenkt werden (Hill JC 1989, Rehani 1992, Hill JC 1994, Reinhard T 1996, Reinhard 1997, Sundmacher 1992). CsA wird talspiegeladaptiert verabreicht (130-150 ng/ml EDTA Vollblut, monoklonaler RIA oder TDx), (Abbildung 13).

Obwohl die Verabreichung von CsA das langfristige Überleben von Transplantaten begünstigt, ist seine Anwendung wegen vielfältiger Nebenwirkungen eingeschränkt. Das Gebiet der unerwünschten Wirkungen umfasst unter anderem die diabetogene Stoffwechsellage, den arteriellen Bluthochdruck, die Hyperlipidämie, die Hepato- und Nephrotoxizität. In einer retrospektiven Studie über die Sicherheit und die Effektivität von CsA von Reinhard und Mitarbeiter 1996 litten 10% der Patienten an Nebenwirkungen. Außerdem benötigt die Talspiegeladaptation des CsA, die mit der Effektivität der Therapie korreliert, eine teure und intensive Überwachung des Medikamentenspiegels und die Compliance des Patienten.

Die lokale Therapie mit CsA beschränkt sich auf die Tatsache, dass die lipophile Substanz zwar eine gute Absorption im Korneaepithel erreicht, jedoch keine oder nur sehr geringe Wirkstoffspiegel intraokular (Pleyer 1994). Nur mit häufiger Tropfanwendung von CsA 2% Augentropfen kann eine ausreichende Immunsuppression geleistet werden. Dieses Ergebnis erklärt sich durch die erreichte systemische CsA-Konzentration im Blut. Deswegen kann die lokale CsA-Applikation nur als zusätzliche Maßnahme bei immunpathologischen Oberflächenproblemen der Hornhaut oder zur Steroideinsparung bei Steroidresponder mit Sekundärglaukom.

**Abbildung 13:** Typischer Zeitverlauf der Cyclosporin-A-Blutspiegelkonzentration nach oraler Einnahme (Pleyer 2003)

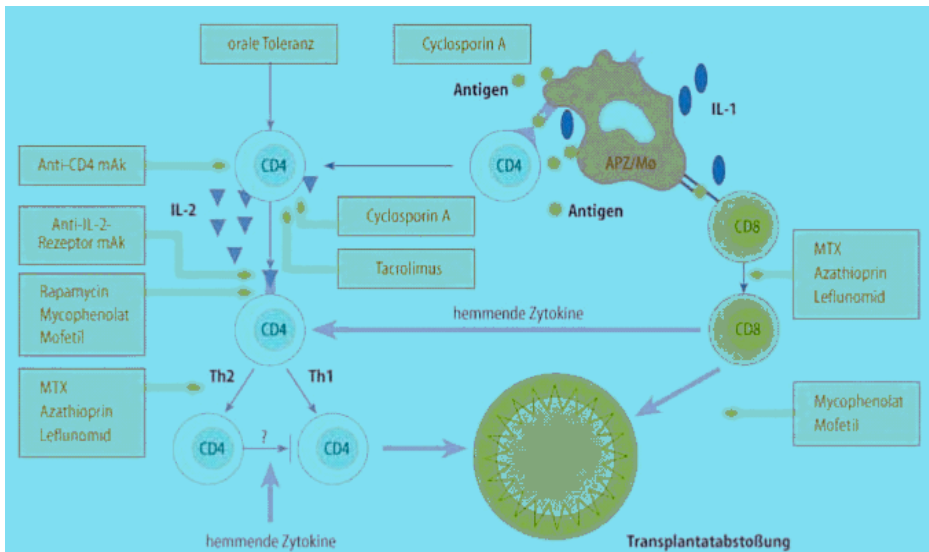


### 1.8.3 Mycophenolat Mofetil

Mycophenolat Mofetil (MMF) ist eine neue immunsuppressiv wirkende Substanz, welche dem CsA gleichwertige Ergebnisse nachgewiesen hat und eine viel versprechende therapeutische Alternative für Patienten, bei denen eine Hochrisiko-Keratoplastik vorgenommen wurde, darstellt (Reis 1999, Reinhard 2001). Wir fingen 1996 an dieses neue Medikament zu verabreichen. Seine Sicherheit und Effektivität in Kombination mit CsA bei Nierentransplantationen wurde in verschiedenen klinischen Studien bewiesen (Deierhoi 1993, European Mycophenolat Mofetil Cooperativ Study Group 1995, The Tricontinental Mycophenolat Mofetil Renal Transplantation Study Group 1996). Mycophenolsäure, der aktive Metabolit von MMF hemmt die Synthese von Guanodinukleosiden und damit die Purinbiosynthese von B- und T-Lymphozyten (Abbildung 14). Somit erklärt sich der selektive Effekt von Mycophenolsäure auf das Immunsystem. MMF hemmt die Proliferation von Lymphozyten und die Antikörperbildung. Möglicherweise wird auch die Wanderung von Leukozyten an den Entzündungsort unterdrückt (Manthey 1998). Systemische Nebenwirkungen sollen beim Einsatz von MMF seltener auftreten als bei CsA (Reis 1999, Reinhard 2001). Die Verabreichung von MMF ist nur systemisch möglich.

**Abbildung 14:** Darstellung des Ansatzes verschiedener immunmodulierender Wirkstoffe auf die Proliferation sensibilisierter Lymphozyten (Pleyer 2003).

(mAK monoklonale Antikörper, MTX Methotrexat).



## 1.9 Transplantatprognose verschlechternde Faktoren

Trotz prophylaktischer systemischer Immunsuppression mit den genannten Substanzen kommt es jedoch nach wie vor zu unbefriedigenden postoperativen Verläufen, insbesondere bei starker Ausprägung und beim gleichzeitigen Vorliegen mehrerer Risikofaktoren. Letztere sind äußerst ausgeprägt bei den Patienten der Studie und werden nachfolgend erwähnt.

### Wirtshornhautvaskularisation

Beim Vorliegen kornealer Neovaskularisationen in drei oder vier Quadranten als Ausdruck der fehlenden Barriere des Limbus bei der Limbusinsuffizienz handelt es sich um Hochrisiko-Keratoplastiken (Völker-Dieben 1989, Hill 1992). Bei Wirtshornhautvaskularisationen ist das erhöhte Risiko für Immunreaktionen in tierexperimentellen (Khodadoust 1969) und vielen klinischen Studien (Gibbs 1974, Allredge 1981, Völker-Dieben 1982 und 1989, Boisjoly 1990, Vail 1993) gesichert. Die plausibelste Erklärung dafür scheint zunächst eine Erleichterung der afferenten und efferenten Immunabläufe zu sein (Friedländer 1993). Die im Zentrum vaskularisierter Hornhäute gefundenen Langerhans-Zellen (Gilette 1982) sowie die

Hornhautvaskularisation per se beeinträchtigen die Induktion von ACAID (Williamson 1987). Welcher der beiden Faktoren den größeren Einfluss hat, ist bislang nicht geklärt.

### **Limbusnahe Transplantatposition**

Die Transplantatgröße erscheint als ein Parameter, der die Prognose der Keratoplastik mit zunehmendem Durchmesser reduziert. Experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Übertragung von HLA-Klasse II tragenden Langerhans-Zellen, die sich in der Hornhautperipherie befinden, wesentlich zur ungünstigeren Prognose großer Transplantate beitragen (Nieder Korn 1990). Weitere Faktoren, die sich ungünstig auswirken, sind die verminderte Distanz zur limbalen Gefäßanbindung (Pleyer 1997). Große oft exzentrische Transplantate werden häufiger für Risikosituationen nach Verätzung, Infektionen u.a. verwendet. Ausschlaggebend bei der Risikoeinstufung sollte sein, ob der Limbus der Wirtshornhaut erreicht wird. Das aber hängt nicht nur vom Transplantatdurchmesser, sondern auch vom Wirtshornhautdurchmesser und von der Transplantatposition ab. So lässt sich auch die schlechte Prognose eines kleinen, aber limbusnah positionierten Transplantates erklären.

### **Rekeratoplastiken**

Rekeratoplastiken gehen immer mit einem deutlich erhöhten Eintrübungsrisiko einher (Völker-Dieben 1982, Maguire 1994, Vail 1993). Dementsprechend ermittelte Maguire (1994) für die erste Keratoplastik eine Eintrübungswahrscheinlichkeit von 16%, für die dritte Keratoplastik dagegen von 55%.

### **Transplantation von Limbus**

Die Transplantation des Limbusstammzellsystems via lamellärer korneolimbaler Transplantate (Herman 1983, Kenyon 1989, Tsai 1990, Tsubota 1995) sowie die Verwendung übergroßer homologer perforierender Transplantate (Duke-Elder 1965) haben technische und immunologische Nachteile. Bei der Limbo-Keratoplastik werden unter Umständen HLA-Klasse-II-positive Langerhans-Zellen mittransplantiert, so dass mit einem hohen Risiko für Immunreaktionen gerechnet werden muss.

## **Schwere atopische Dermatitis mit konsekutiv ausgeprägten Veränderungen des vorderen Augenabschnittes**

Die atopische Dermatitis ist eine chronische Entzündung, charakterisiert durch eine Vielzahl von Hautveränderungen, die oft die Augenlider einschließen. Daher kann die Lidhaut Papeln, Rhagaden, Lichenifizierungen und die Bindehaut eine gigantopapilläre Hyperplasie oder Granulome aufweisen. Die Bindehaut produziert pathologischen, sehr zähen Schleim und neigt zu Schrumpfung mit nachfolgender Symblepharonbildung und Lidfehlstellung (Duke-Elder 1965, Smolin 1983, Friedlaender 1993). Der Tränenfilm kann erhöhte Viskosität aufweisen. Die Hornhaut kann involviert sein und zeigt im Rahmen einer Keratopathia atopica eine Keratitis superficialis punctata, Erosionen, Infiltrate oder Ulzera (Smolin 1983), sowie eine erhöhte Inzidenz eines Keratokonus (Rahi 1977). Auch ist die Inzidenz einer Katarakt und die von Netzhautablösungen gesteigert (Cordes 1946, Vetter 1952, Hurlbut 1954, Coles 1957, Klemens 1962). Hinzu kommen eine Reihe allgemeiner immunologischer Besonderheiten, die zu viralen und bakteriellen ophthalmologischen Infektionen prädisponieren. So ist die IgE-Konzentration im Serum oft erhöht (Gigli 1979, Smolin 1983, Butrus 1984), was die Atopiker zum Reiben in der Periorbital- und Augenregion verleitet. Dieser mechanische Faktor spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entwicklung dermatologischer, konjunktivaler und kornealer Läsionen, und möglicherweise die entscheidende in der Entwicklung von Keratokonus, Katarakt und Netzhautablösung (Cameron 1989). Die perforierende Keratoplastik kann in zwei Indikationsgruppen notwendig werden: Patienten mit Keratokonus oder Keratitis bei schwerem endogenem Ekzem. In beiden Gruppen muss mit folgenden schwierigen postoperativen Komplikationen gerechnet werden:

1. Störungen der Transplantatoberfläche. Das Transplantat ist von erheblichen Epithelheilungsstörungen bedroht, die auf die pathologische Lidkanten-, Bindehaut- und Tränensituation zurückgehen.
2. Virale, bakterielle und mykotische Transplantatinfektionen, verursacht durch die immunologischen Besonderheiten. Die postoperative, topische Kortikosteroidapplikation kann dieses Problem verstärken.
3. Erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Immunreaktionen. Die Hauptursache dafür liegt in der u.U. nicht unerheblichen Wirtshornhautvaskularisation bei atopischer Keratopathie. Die durch ständige Oberflächenirritation bedingte Unmöglichkeit, suffizient lokal Kortikosteroide zu applizieren, kann als weitere Ursache des erhöhten Immunreaktionsrisikos betrachtet werden.

Für die Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis und konsekutiv ausgeprägten Veränderungen des vorderen Augenabschnittes erweist sich die systemische Applikation von Cyclosporin A als effektive Prophylaxe zur Vermeidung der Transplantatkomplikationen nach perforierender Keratoplastik (Reinhard 1999). Die Effektivität des systemischen Cyclosporin A kann dadurch erklärt werden, dass es eine positive Wirkung auf die Haut, den Tränenfilm und die konjunktivale und korneale Oberflächenstabilität ausübt. Konsekutiv bewirkt die intakte korneale Oberfläche, dass bakterielle Infektionen am Transplantat seltener auftreten. Des Weiteren demonstrierte Hawkins 1996, dass durch die systemische Applikation von Cyclosporin A die Entstehung von Neovaskularisationen auf dem Hornhauttransplantat inhibiert wird.

### **Steroidresponse-Glaukom**

Eine präoperative Glaukomanamnese bedingt eine Verschlechterung der Transplantatprognose (Reinhard 1997). Diese Situation sollte daher den Hochrisiko-Keratoplastiken zugeordnet werden. Bei einem langfristig erhöhten Augeninnendruck kann es durch einen allmählichen Endothelschaden (Reinhard 2001) zum Transplantatversagen kommen.

Mitverantwortlich für postoperative Glaukomprobleme ist eine zur Vermeidung von Immunreaktionen erforderliche Kortikosteroidapplikation (Stewart 1979, Goldberg 1981). Ein Steroid-induziertes Glaukom in Kombination mit bullöser Keratopathie wird als Hochrisiko-Situation betrachtet, da man postoperativ auf topische Steroidapplikation verzichten sollte. In der Literatur ist ein starker Anstieg der Inzidenz von immunologischen Ereignissen in dieser Situation bekannt (Sundmacher 1977, 1983). Ist beispielsweise bereits präoperativ klar, dass es sich bei einem Patienten um einen sogenannten Kortikosteroidresponder handelt, so muss über eine systemische Cyclosporin A Applikation nachgedacht werden, um die notwendige lokale Kortikosteroiddosis so gering wie möglich zu halten und so ein Kortikosteroidglaukom vermeiden zu können.

## **1.10 Immunreaktionen**

Immunologische Abstoßungsreaktionen sind die Hauptursache von Transplantatversagen nach perforierender Keratoplastik (Arentsen JJ 1983, Khodadoust AA 1973, Reinhard 1996). Während bei bestimmten Standardindikationen wie beim Keratokonus aufgrund verbesserter

Gewebekonservierung, Operationstechnik und postoperativer Therapie heute mit bis zu 95% klaren Transplantaten zu rechnen ist (Reis, Reinhard et al 1999), ist die Abstoßungsrate ohne systemische Immunsuppression bei Hochrisikokeratoplastiken sehr hoch. Akute Abstoßungsreaktionen können bis zu 75% in manchen Hochrisikogruppen auftreten (Reinhard 1996, Hill JC 1994)

### **1.11 Visusauswertung**

Die Abstufung zwischen den einzelnen Sehschärfewerten entspricht nur dann der Empfindungsstärke, wenn logarithmisch skaliert wird (Ferris et al. 1982; Paliaga 1993). Warum dies so ist, kann man sich am besten an zwei Beispielen klar machen: Für einen Patienten, der nur über eine Sehschärfe von 0,1 verfügt, ist ein Anstieg um 0,1 auf 0,2 ein großer Gewinn, denn die Sehschärfe hat sich verdoppelt, und der Patient kann nun ein Schild aus einer doppelt so großen Entfernung lesen. Für einen Patienten mit der Sehschärfe 0,8 hingegen ist eine Erhöhung um 0,1 auf 0,9 praktisch unbedeutend, denn die Sehschärfe hat sich nur um den Faktor  $0,908 = 1,125$  verbessert. Aus diesen Beispielen geht hervor, dass die Sehschärfe nicht in arithmetisch gleichen Abständen, sondern geometrisch mit einem konstanten Faktor, also logarithmisch, skaliert sein sollte.

Zum Mitteln der Sehschärfe gibt es zwei korrekte Methoden, die mathematisch identisch sind: die geometrische und die "logarithmisch" bezeichnete Mittelung (Bach 1998). Der geometrische Mittelwert ist die n-te Wurzel aus dem Produkt der Einzelwerte. Bei der logarithmischen Mittelung muss man zuerst die einzelnen Sehschärfewerte logarithmieren, dann arithmetisch mitteln und schließlich den erhaltenen Wert "delogarithmieren" (=exponenzieren). Beide Verfahren sind mathematisch äquivalent und führen daher zum selben Ergebnis.

## **1.12 Studiendesign und Fragestellung**

In dieser Arbeit sollte die Langzeitprognose der allogenen homologen Limbo-Keratoplastik untersucht werden und herausgefunden werden, ob die transplantierten Limbusstammzellen langfristig überleben. Das Überleben der Limbustransplantate wurde unter besonderer Berücksichtigung des HLA-Matching und der Immunsuppression studiert.



## **2 Patienten und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In die Studie wurden nur Patienten mit totaler Limbusinsuffizienz eingeschlossen.

Die Diagnose der totalen Limbusinsuffizienz wurde ausschließlich klinisch durch das Vorhandensein einer zirkulären Konjunktivalisierung der Hornhaut als Hauptkriterium gestellt.

Von insgesamt 48 Patienten waren 15 weiblich und 33 männlich mit einem mittleren Lebensalter von 50,6 +/- 16,3 Jahren. Bei 27 Patienten lag eine Verätzung vor, bei 5 Patienten eine Verbrennung, bei 6 Patienten ein Pemphigoid oder Pseudopemphigoid, bei 3 Patienten eine chronische Blepharokonjunktivitis, bei 3 Patienten eine kongenitale Aniridie, bei einem Patient ein Stevens Johnson Syndrom und bei 3 Patienten eine idiopathische Limbusstammzellinsuffizienz. Der Begriff idiopathisch weist darauf hin, dass die Ursache der Limbusstammzellinsuffizienz hier unklar war.

Keiner der Patienten hatte eine Herpes-Anamnese.

Die Patienten wurden ausführlich über die homologe perforierende Limbo-Keratoplastik, über die postoperative systemische Immunsuppression, über die Dokumentation aller Patientendateien in der prospektiven Studie und über die Zweckmäßigkeit einer Bürstenabrasio der Epithelzellen des Transplantates informiert und gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis .

Die Patientendaten der Hauptgruppe können der Tabelle 1 entnommen werden. Die perforierende Keratoplastik wurde von nur 3 Operateuren nach einem standardisierten Schema vorgenommen.

**Tabelle 1:** Patientendaten der Hauptgruppe

Alter (Jahre)	50,6 ± 16,3
Geschlecht (m/w)	33/15
Follow up (Tage)	775 ± 608
Anzahl von vorangegangenen Keratoplastiken	0: 21 Patienten 1: 11 Patienten 2: 10 Patienten 3: 4 Patienten 4: 1 Patient 5: 1 Patient
Systemisches CsA	39 Patienten
Systemisches MMF	1 Patient
Systemisches CsA+MMF	8 Patienten
Dauer systemischer Immunsuppression (Monate)	14,2 ± 7,2

## 2.2 Hornhautspender

Kurzzeitkultivierte Transplantate wurden nur bis zum 31.12.94 verwendet. Sie wurden innerhalb von 48 Stunden post mortem entnommen und in Kurzzeitkonservierungsmedien (Likorol®, 4°C) bis zu 24 Stunden konserviert. Danach wurden ausschließlich organkultivierte Transplantate verwendet, die nach den Kriterien der EBBA konserviert wurden (EBBA 2000). 21 Transplantate wurden von der LIONS-Hornhautbank Nordrhein-Westfalen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu Verfügung gestellt. Die Transplantate stammten von Spendern, die über das Institut für Rechtsmedizin sowie die internistischen und chirurgischen Intensiv- und Pflegestationen der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität rekrutiert werden konnten. Vor der Entnahme wurde in allen Fällen das Einverständnis der nächsten Angehörigen eingeholt. Zehn Transplantate wurden über BIS (Bioimplant Services Leiden, Niederlande) bezogen.

Die Spender- und Transplantatdaten der Hauptgruppe können der Tabelle 2 entnommen werden

**Tabelle 2:** Spender- und Transplantatdaten

Spenderalter (Jahre)	54,5 ± 16,1
Post mortem Zeit (Minuten)	897 ± 1012
Organkultur (n)	31
Kurzfristige Kultur (n)	17
Organkulturdauer (Tage)	17,0 ± 4,5
Präoperative endotheliale Zelldichte (Zellen/mm <sup>2</sup> )	2488 ± 266
Transplantat-Durchmesser	
<8,0 mm (n)	26
>8,0 mm (n)	22

**Tabelle 3:** Transplantatherkunft

Transplantat-Art	Frische Transplantate	Transplantate aus der Hornhautbank-Düsseldorf	Transplantate aus externen Hornhautbanken
Anzahl der Transplantate	17	21	10

Alle Transplantate wiesen unabhängig von der Art der Konservierung zum Operationspunkt ein intaktes Epithel und Endothel auf. Die Qualität des Endothels wurde durch Spiegelmikroskop- und Phasenkontrastmikroskopuntersuchung dokumentiert. Die präoperative endotheliale Zelldichte betrug  $2488 \pm 266$  Zellen/mm<sup>2</sup>.

## **2.3 HLA-Matching**

Alle serologischen HLA A, B und alle molekulargenetischen HLA DRB, DRQB Typisierungen der Empfänger und Spender der Studie wurden in einem Labor durchgeführt, das bei der American Society for Histocompatibility and Immunogenetics akkreditiert ist (Wernet 1998). Für das HLA-Matching wurden nur Broad Antigene (Klasse I: A, B; Klasse II: DR) berücksichtigt. Für die Auswertung wurden gut gematchte Transplantate (HLA Mismatches: 0-1) mit weniger gut gematchten Transplantaten (HLA Mismatches: 2-6) und untypisierten Transplantaten verglichen. Von den 48 Patienten haben 26 Patienten gematchte Transplantate bekommen. Dreizehn davon bekamen ein Transplantat mit 0 bis 1 Mismatches (0 Mismatches bei 5 Patienten, 1 Mismatch bei 8 Patienten) und 13 andere Patienten erhielten ein Transplantat mit 2 bis 6 Mismatches (2 Mismatches bei 6 Patienten, 3 Mismatches bei einem Patient, 4 Mismatches bei 4 Patienten, 5 Mismatches bei einem Patient, 6 Mismatches bei einem Patient).

## **2.4 Perforierende Keratoplastik mit Limbus**

### **2.4.1 Technik der homologen zentralen Limbo-Keratoplastik**

Meist erfolgte die Keratoplastik in Retrobulbäranästhesie, wobei 5 ml eines Bupivacain-Mepivacain-Hyaluronidase-Epinephrin-Gemisches retrobulbär injiziert wurden. Um den Glaskörperdruck zu senken, wurden ein Okulopressor mit circa 40 mmHg angelegt und 250 mg Acetazolamid intravenös appliziert.

Eine Intubationsnarkose war nur bei Patienten nötig, die nicht schmerzfrei ruhig auf dem Rücken liegen konnten, bei mangelnder Compliance, bei geistig Behinderten oder bei sehr ängstlichen Patienten.

Die chirurgischen Eingriffe wurden von einem der 3 erfahrenen Chirurgen unserer Klinik durchgeführt. Die Trepanation wurde mittels modifiziertem Handtrepan nach Franceschetti durchgeführt, zunächst für die Spenderhornhaut von endothelial (Durchmesser 7,7-10 mm) und danach für die Wirtshornhaut von epithelial (Durchmesser 0,2-0,3 mm kleiner als der Transplantatdurchmesser). Die Spenderhornhäute wurden so exzentrisch trepaniert, dass Limbusstammzellen in ca. 40% der Hornhautperipherie enthalten waren.

Das Transplantat wurde zunächst mit 4 Einzelknüpfnähten mit nicht resorbierbarem, monofilem Nylonfaden der Stärke 10.0 (amerikanische Pharmakopoe USP), der sich nach Mackensen (1966) besonders eignet, um ein Einheilen des Transplantates ohne chronische Entzündungsreaktion oder Neovaskularisation zu gewährleisten, bei 3, 6, 9, 12 Uhr fixiert.

Danach wurde eine doppelt fortlaufende gekreuzte diagonale Naht nach Hoffmann mit 2 mal 8 Durchstichen gelegt (Hoffmann 1976). Vorteil dieser Nahttechnik ist, dass klaffende innere und äußere Wundränder vermieden werden. Die Einzelknüpfnähte wurden entfernt und bei Bedarf wurden zusätzliche, nur randadaptive Einzelnähte zugefügt.

Die Entfernung des ersten fortlaufenden Fadens wurde nach frühestens 4 bis 6, die des zweiten nach frühestens 12 bis 18 Monaten in Tropfanästhesie mit Proxymetacain AT vorgenommen.

#### **2.4.2 Tripel-Operation**

In dieser Studie wurde bei 20 Patienten von insgesamt 48 mit Limbusstammzellschäden eine Tripel-Operation vorgenommen. Es handelte sich in 18 Fällen um eine extrakapsuläre Kataraktextraktion mit Implantation einer intraokulären Linse. Bei den 2 anderen Patienten wurde eine extrakapsuläre Kataraktextraktion mit einer Irisblenden-Linse im Sulcus mit der Hornhaut-Limbus-Verpflanzung kombiniert. Zehn von den 48 Augen waren zum Zeitpunkt der Limbo-Keratoplastik pseudophak. Bei einem Patienten wurde eine Kataraktoperation mit Hinterkammerlinseneinpflanzung nach der Limbo-Keratoplastik durchgeführt.

Außer der Tripel-Operation wurden nach Bedarf weitere operative Eingriffe gleichzeitig mit der Limbo-Keratoplastik durchgeführt. So wurde bei 4 Patienten eine periphere Iridektomie vorgenommen, bei 4 Patienten eine vordere Vitrektomie, bei 3 Patienten eine Irisplastik, bei 3 Patienten eine vordere Synechiolyse, bei einem Patienten eine Pupilloplastik, bei einem anderen Patienten eine Irisnaht, bei einem Patienten eine Hinterkapseldiszision, bei einem Patienten eine Sektoriridektomie, bei einem Patient eine Schöpfernaht und bei einem Patienten eine vordere Rekonstruktion bei einem Zustand nach Verbrennung.

## **2.5 Nachbehandlung**

### **2.5.1 Standardtherapie nach der Keratoplastik**

Am Ende der Operation wurde ein Gemisch aus 0,5 ml Gentamycin 4% und 0,5 ml Dexamethason-21-acetat 0,8% subkonjunktival injiziert. Lokal wurde wenigstens bis zur kompletten Transplantat-Epithelialisierung Gentamycin 0,5% AS 5-mal täglich appliziert. Danach wurde Prednisolon-21-acetat 1% AT – soweit dies der Zustand des Transplantatepithels zuließ – 5-mal täglich im ersten, 4-mal täglich im zweiten, 3-mal täglich im dritten, 2-mal täglich im vierten und 1-mal täglich im fünften Monat gegeben. Langfristig wurden möglichst 2-3 Steroidtropfen täglich beibehalten, was fast immer ohne Nebenwirkungen möglich war. Systemisch wurden postoperativ etwa 1-1,5 mg Fluocortolon/kg Körpergewicht oral verordnet und innerhalb von 2 bis 3 Wochen ausgeschlichen. Zusätzlich wurde postoperativ Azetazolamid oral verordnet, um einen Augeninnendruckanstieg zu vermeiden. Das Therapieschema ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Therapieregime nach einer perforierenden Keratoplastik**

Medikament	Darreichungsform	Konzentration	Verabreichung
Gentamycin	0,5 ml Injektionslösung	4 %	subconjunktival am Operationsende gespritzt
Dexamethason- 21-acetat	0,5 ml	0,8 %	subconjunktival am Operationsende injiziert
Gentamycin	Augensalbe	0,5 %	5-mal tägl. wenigstens bis zur kompletten Transplantatepithelialisierung
Fluocortolon	Tablette	1-1,5 mg/ kg KG	tägl.; innerhalb von 2-3 Wochen ausschleichend
Acetazolamid	Tablette	2 mal 250 mg	am Operationstag
Prednisolon-21- acetat	Augentropfen	1 %	5-mal tägl./ 1.Monat
		1 %	4-mal tägl./ 2.Monat
		1 %	3-mal tägl./ 3.Monat
		1 %	2-mal tägl./ 4.Monat
		1 %	1-mal tägl./ 5.Monat

## 2.5.2 Systemische Immunsuppression

### 2.5.2.1 Cyclosporin A

CsA (Sandimmun optoral ®) wurde 2-mal täglich oral appliziert, wobei die individuelle Dosis an den EDTA-Vollblutspiegeln 12 Stunden nach der letzten Einnahme im monoklonalen TDx ausgerichtet wurde (monoclonaler TDx, Abbott Exsym). Als Sollgröße wurden die nach Nierentransplantation üblichen langfristigen Vollblutspiegel zwischen 120 und 150 ng/ml gewählt. Die CsA Applikation wurde bei einem Transplantatversagen unmittelbar beendet. Ansonsten wurde bei klarem Transplantat angestrebt, die systemische CsA Applikation nach 12 Monaten innerhalb von 6-8 Wochen regressiv zu beenden.

### 2.5.2.2 Mycophenolat Mofetil (MMF)

In dieser Studie wurde MMF als Monoprophylaxe nur bei einem Patienten verabreicht. Dieser Patient wies Kontraindikationen gegen die Applikation von CsA auf. Zweimal täglich wurde 1 g MMF verabreicht. Als wir nach langem follow-up beobachteten, dass viele Transplantate von Patienten, die eine homologe perforierende Limbo-Keratoplastik erhalten hatten, eintrübten, haben wir uns dafür entschieden, die Patienten mit einer Kombinationstherapie von CsA und MMF zu behandeln. Das war bei 8 Patienten der Fall.

**Tabelle 5:** Systemische immunsuppressive Therapie unter Berücksichtigung der HLA-Typisierung

		Immunsuppression			Gesamt
		MMF	CsA	CsA+ MMF	
HLA-MM	0-1 MM	1	9	3	13
	2-6 MM	0	11	2	13
	Untypisiert	0	19	3	22
Gesamt		1	39	8	48

### 2.5.2.3 Systemische Immunsuppressionsdauer

Die tatsächliche Applikationsdauer der CsA- bzw. MMF-Immuprophylaxe variierte und wurde vom ophthalmologischen Befund im Einzelfall abhängig gemacht. Die tatsächliche, mittlere Applikationsdauer von systemischem Cyclosporin A lag bei 14,2 Monaten. Hierin eingerechnet ist eine durchschnittlich zweimonatige Ausschleichsphase mit Reduzierung der täglichen CsA-Dosis um 50 mg alle zwei Wochen. Die Therapiedauer mit systemischem MMF inklusive der Ausschleichsphase betrug 2,0 Monate (Tabelle 4).



**Tabelle 6:** Systemische Immunsuppressionsdauer unter Berücksichtigung der HLA-Typisierung

HLA-MM		CsA Suppressionsdauer (Monate)	MMF Suppressionsdauer (Monate)
0-1 MM	Mittelwert	14,00	3,2
	n	13	13
	Standard- abweichung	8,9	5,5
2-6 MM	Mittelwert	11,0	1,2
	n	13	13
	Standard- abweichung	5,0	3,9
Untypisiert	Mittelwert	16,1	1,7
	n	22	22
	Standard- abweichung	6,8	5,6
Insgesamt	Mittelwert	14,2	2,0
	n	48	48
	Standard- abweichung	7,2	5,1

#### 2.5.2.4 Voruntersuchung der Patienten

Vor Einleitung der systemischen MMF- bzw. CsA-Prophylaxe wurde eine internistische Untersuchung in der Abteilung für Nephrologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Hinblick auf Kontraindikationen durchgeführt. Insbesondere wurden Malignome, Leber-, Nieren- oder gastrointestinale Erkrankungen ausgeschlossen. Als Ausschlusskriterien galten ferner eine durchgemachte oder aktive maligne Erkrankung, serologische Evidenz für HIV oder Hbs-Ag, therapiebedürftige akute oder systemische Infektionen, ulzerative gastrointestinale Erkrankungen, inadäquate Kontrazeption, Schwangerschaft, sowie ein Lebensalter unter 18 Jahren. Patienten mit okulären Herpesinfektionen oder akuter mikrobieller Keratitis wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen.

In dieser Studie wurden 39 Patienten ausschließlich mit CsA, 1 Patient ausschließlich mit MMF und 8 Patienten mit CsA und MMF behandelt.

Die Effektivitätsparameter der CsA-/MMF-Therapie waren klares Transplantatüberleben, das Vorkommen klinisch manifester Immunreaktionen, die beispielsweise mit Endothelpräzipitaten, Khoudadoust Linie oder Stroma-Ödem einhergehen, und das Ausmaß des postoperativen Endothellzellverlusts der Transplantate.

### **2.5.3 Chirurgische Eingriffe nach der Limbo-Keratoplastik**

Nach der Durchführung der Limbo-Keratoplastik wurden die unten genannten operativen Eingriffe bei den Patienten der Studie durchgeführt. Bei 12 Patienten wurde eine intraokuläre Tensiomessung, bei 11 Patienten eine Zyκλο-Photo-Koagulation, bei 2 Patienten eine Vorderkammerspülung und bei einem Patienten eine vordere Synechiolyse durchgeführt.

## **2.6 Postoperative Kontrollen**

Postoperative Kontrolluntersuchungen wurden nach 6 Wochen, 4 und 12 Monaten sowie danach einmal jährlich durchgeführt, wobei ein Teil der Patienten mit komplikationslosem Verlauf die Notwendigkeit einer Nachuntersuchung nicht einsah, ein weiterer Teil unbekannt postoperativ verzog, so dass keine weitere Recherche möglich war und die folgenden Kontrolluntersuchungen ausbleiben mussten. Ein weiterer Drop-Out war vor allem bei den älteren Patienten zu verzeichnen durch schwere Allgemeinerkrankungen, die ein Kommen unmöglich machten.

Jeder Patient wurde über mögliche postoperative Komplikationen aufgeklärt und ausdrücklich darauf hingewiesen, bei allen Problemen unverzüglich den Augenarzt aufzusuchen oder sich direkt an die Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu wenden. Die begleitende internistische Überwachung während und nach der CsA- bzw. MMF-Prophylaxe wurde von der Abteilung für Nephrologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Zusammenarbeit mit dem jeweiligen Hausarzt übernommen. Die internistischen Kontrollen sahen die Anamnese zu Nebenwirkungen, körperliche Untersuchungen und Labortests vor. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit aller Patienten betrug 776 +/- 609 Tage (min: 70 Tage, max: 2338 Tage)

### **2.6.1 Untersuchungsablauf**

Bei jedem Patienten wurden folgende Messungen erhoben:

Refraktion, Visus (Brille, Autorefraktometer, subjektiver Abgleich)

Keratometrischer Astigmatismus (Zeiss, CL 110)

Spaltlampenuntersuchung

Applanatorische/ palpatorische Augendruckmessung

Ophthalmoskopische Untersuchung in Mydriasis

Endothelzelldichte (siehe unten)

Die Endothelzelldichte wurde mit einem Non-Kontakt Biomikroskop der Firma Konan, Japan gemessen. Hiermit kann die zentrale Endothelzelldichte aufgrund des halbautomatischen Zählverfahrens weitgehend reproduzierbar erfasst werden (Landesz 1995, Olsen 1979).

### **Visusauswertung**

Bei der Visusauswertung wurde die den Empfindungsstufen angemessene logarithmische Skalierung der Sehschärfe berücksichtigt.

Zum Mitteln der Sehschärfe wurde in dieser Studie die als "logarithmisch" bezeichnete Methode ausgewählt (Bach 1998). Der geometrische Mittelwert ist die n-te Wurzel aus dem Produkt der Einzelwerte. Bei der logarithmischen Mittelung wurden zuerst die einzelnen Sehschärfewerte logarithmiert, dann arithmetisch gemittelt und schließlich wurde der erhaltene Wert "delogarithmiert" (=exponenziert).

### **2.7 Immunreaktionen**

Als schwere wurden endotheliale Immunreaktionen bezeichnet, wenn ein Transplantatödem mit Transplantatendothelpräzipitaten vorlag. Als leichte wurde eine endotheliale Immunreaktion eingestuft, wenn frische und pigmentierte Transplantatendothelpräzipitate ohne Transplantatepithelödem und/oder -stromaödem, wohl aber mit umschriebenem, spiegelmikroskopisch sichtbarem Endothelzellödem vorlagen. Schwere stromale Immunreaktionen wurden diagnostiziert, wenn infiltrative Transplantateinschmelzungen, leichte

stromale Immunreaktionen hingegen, wenn stromale nummuläre Transplantattrübungen jeweils ohne Anhalt für eine infektiöse Ursache vorlagen. Wegen der Schwierigkeiten der Abgrenzung epithelialer Immunreaktionen von anderen epithelialen Störungen wurde auf eine Einbeziehung epithelialer Immunreaktionen verzichtet. Bei schweren endothelialen und stromalen Immunreaktionen wurden lokal stündlich Prednisolon-21-acetat 1% AT getropft, subkonjunktival 1 ml Dexamethason-21-acetat 0,8% gespritzt und systemisch 1-1,5 mg Fluocortolon/kg Körpergewicht gegeben. Diese Therapie wurde in Abhängigkeit vom individuellen klinischen Befund ausgeschlichen. Bei leichten endothelialen und stromalen Immunreaktionen wurden 5-mal Prednisolon-21-acetat 1% AT täglich verordnet, die ebenfalls in Abhängigkeit vom individuellen klinischen Befund langsam reduziert wurden.

Anders als bei den endothelialen und stromalen Immunreaktionen war die Diagnose einer Immunreaktion gegen die transplantierten Limbusstammzellen schwer zu stellen. Letztere wurde in dem Fall vermutet, wenn der transplantierte Limbus eine ödematöse Ansicht bekam und/ oder wenn die Gefäße in dem transplantierten Limbus dilatiert waren und/ oder wenn Störungen der Epitheloberfläche der Spenderhornhaut nicht zurückgingen (Reinhard 1999, Daya 2000).

## **2.8 Funktion des Limbus / Abradate**

Es wurde die immunogenetische Analyse des Hornhautepithels einer Gruppe von 9 Patienten untersucht. Sie waren schriftlich über die Prozedur informiert und gaben hierfür Epithelzellen der Hornhaut. Bei 7 von 9 Patienten wurde ausreichendes Material für die immunogenetische Analyse gewonnen und bei 2 Patienten war der Materialgewinn für das immunogenetische Verfahren unzureichend. Sechs Transplantate waren klar und eins war nach einer Immunreaktion gegen die Limbusstammzellen abgestoßen und seine Oberfläche konjunktivalisiert. Die Zellen wurden sorgfältig von der Oberfläche der Konjunktiva des Empfängers (Empfängerkontrolle) und von 3 Stellen des Transplantates (transplantiertes Limbus, Zentrum des Transplantates und Stelle des Transplantates gegenüber dem Limbus) abgetragen. Es wurden Bürsten (Accellon™ Multi, Medscan Medica AB, Malmö, Schweden) verwendet. Danach wurden die Bürsten in eine Suspension mit BSS™ gelegt und bis zur immunogenetischen Analyse bei -80°C aufbewahrt. Außerdem wurden 6 von 9 korneoskleralen Ringen (Spenderkontrolle) analysiert, welche unmittelbar nach der Limbo-Keratoplastik bei -80°C eingefroren wurden.

Die Bürsten wurden mehrmals gewaschen und zentrifugiert, um möglichst mehrere Zellen zu gewinnen. Die korneoskleralen Ringe der Spender wurden abgekratzt und mit der gleichen Methode wie bei den Bürsten behandelt. Die DNA wurde entweder durch die Verwendung von QIAmp Tissue Kit (korneosklerale Ringe) oder durch die Verwendung von QIAmp Blood Kit (Bürste) extrahiert. Die Amplifikation wurde durch die Verwendung eines alpha kit Formates des PowerPlex™ 16 kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) nach den Anweisungen des Herstellers eingeleitet. Dieses Kit ermöglicht die Amplifikation von 15 autosomalen short-tandem-Repeats (STR) loci und des geschlechtsspezifischen Amelogenin-locus. STR-Loci sind nichtkodierende einfache DNA Sequenzen von einer Länge von 2 bis 6 Basenpaare, welche sich von 5 bis 100mal reihenweise wiederholen. Die hohe Differenzierung unter den Menschen, welche das Vorstehen von Unterschieden an der Anzahl der wiederholenden Einheiten (repeat units) herausfordert, erlaubt eine individuelle Identifikation (Ludes 2000). Im Unterschied zum HLA-System (lokalisiert im Chromosom 6) sind die STR-Loci in verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Dafür gibt es keine Korrelation zwischen den HLA- und den STR-Loci (Budowle 2001, Ludes 2000, Moretti 2001). Die Allele werden mittels PCR amplifiziert und können dann durch Kapillarelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und nachgewiesen werden. Die Produkte der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden im ABI Prism310 genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) analysiert. Sie wurden für die Kapillarelektrophorese vorbereitet, indem 1 µl des Substrates in 12,5 µl deionisiertem Fosfamid und 0,5 µl von International Lane Standard 600 (Promega) addiert wurden (Moretti 2001). Die Mischung wurde dann bei 95° C für 3 Minuten geheizt, um danach sofort bei 4° C für weitere 3 Minuten gekühlt zu werden. Die Elektrophorese wurde bei 15 kV und bei einer Temperatur von 60° C mit Performance Optimized Polymer 4 (Applied Biosystems) als Separationsmedium induziert (Budowle 2001, Moretti 2001). Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des GeneScan 3.1 Software analysiert.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Das klare Transplantatüberleben und der Anteil der Transplantate ohne Immunreaktionen wurden nach Kaplan und Meier geschätzt (Kaplan 1958). Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 10.0 auf Windows NT 4.0, Service Pack 6.

Die mit dem Kaplan-Meier-Estimator berechneten Überlebenskurven (Life-table-Kurven) stellen den fünfjährigen Verlauf der Effizienzparameter der Studie dar. Die Differenzen zwischen den verschiedenen Untergruppen und die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Log-Rank-Test berechnet (Mantel-Cox-Test) (Mantel 1966). Statistische Signifikanzen wurden als Wert  $p$  angegeben und die Ergebnisse im Falle  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

Im nächsten Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie dargestellt. Die Patienten wurden je nach HLA-Matching in gut (0-1 Mismatches), schlecht (2-6 Mismatches) und untypisiert unterteilt. Der Anteil klarer Transplantate nach fünf Jahren sowie der Anteil der nicht von Immunreaktionen betroffenen Hochrisiko-Keratoplastiken wurde für jede Untergruppe nach der Kaplan Meier Methode (1958) berechnet. Darüber hinaus wurden die Verteilungsmuster der Immunreaktionen verglichen (Auftreten vor/nach Beendigung der Immunsuppression, endothelial/stromal/gegen den Limbus gerichtet).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überlebensanalysen der Patientengruppe

Während der gesamten Nachbeobachtungszeit von  $776 \pm 609$  Tagen trübten 29 von den 48 Transplantaten ein (Tabelle 7). Der nach Kaplan Meier berechnete Anteil der klaren Transplantate lag 5 Jahre postoperativ bei 30% in der gesamten Gruppe (Abbildung 19). Der Anteil der klaren Transplantate in der Gruppe mit 0-1 Mismatches lag bei 65%, in der Gruppe mit 2-6 Mismatches bei 41% und in der Gruppe der untypisierten Transplantate bei 14% (Abbildung 20).

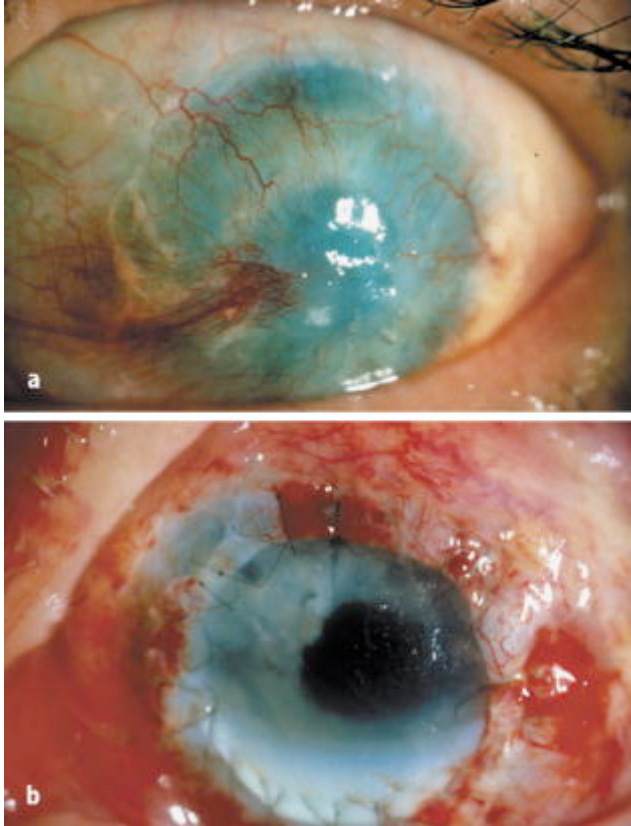
Vier von 13 Transplantaten mit 0-1 Mismatches trübten im Gegenteil zu 7 von 13 Transplantaten mit 2-6 Mismatches und 19 von 22 untypisierten Transplantaten ein. Der Chi-Quadrat-Test von HLA-Mismatching und die Überlebensrate der Transplantate zeigte einen p-Wert kleiner als 0,01.

**Tabelle 7: HLA-Matching und Transplantatüberleben**

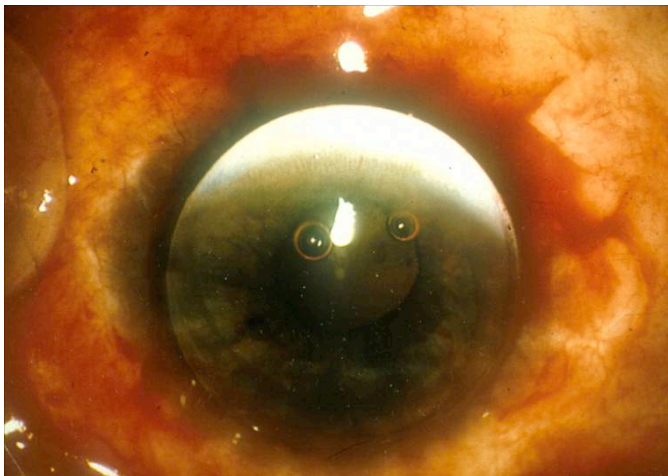
(Chi-Quadrat Test,  $p < 0,01$ )

Anzahl von Mismatches	n	n Überleben / n Abstoßung	Follow up (Monate)
0-1	13	9/4	$886 \pm 563$
2-6	13	7/6	$794 \pm 711$
untypisiert	22	3/19	$700 \pm 587$
insgesamt	48	19/29	$776 \pm 609$

**Abbildung 15:** a Rechtes Auge einer 54-jährigen Patientin nach schwerster Verätzung und zirkulärer Limbustammzellinsuffizienz. b Dieselbe Patientin unmittelbar nach der homologen Limbo-Keratoplastik.

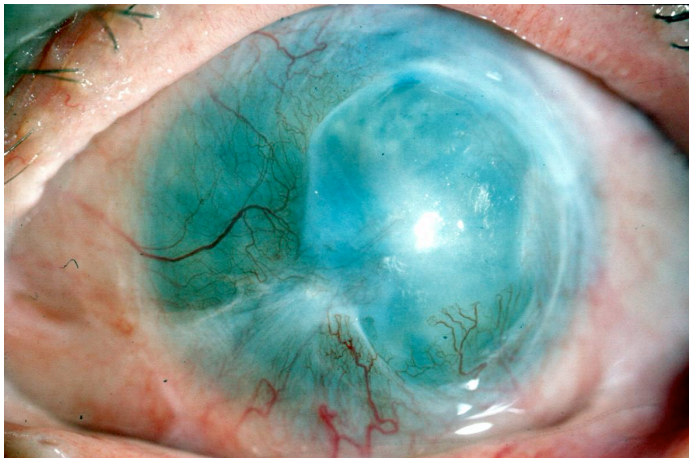


**Abbildung 16:** Auge während homologer perforierender Limbo-Keratoplastik. Die Limbusstammzellen sind in etwa 40% der Zirkumferenz des Transplantats enthalten.

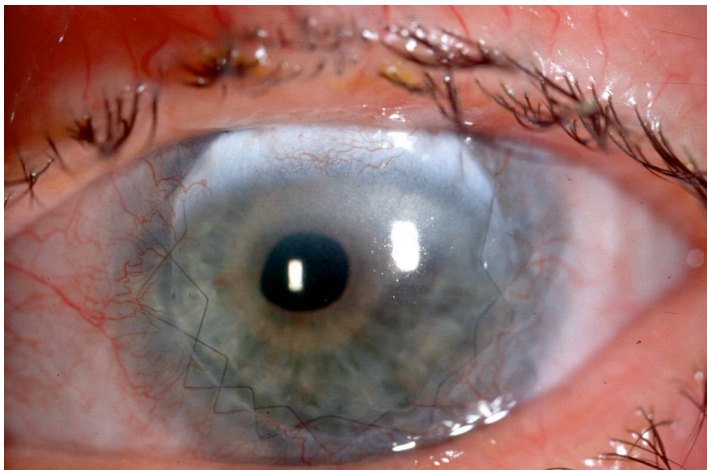




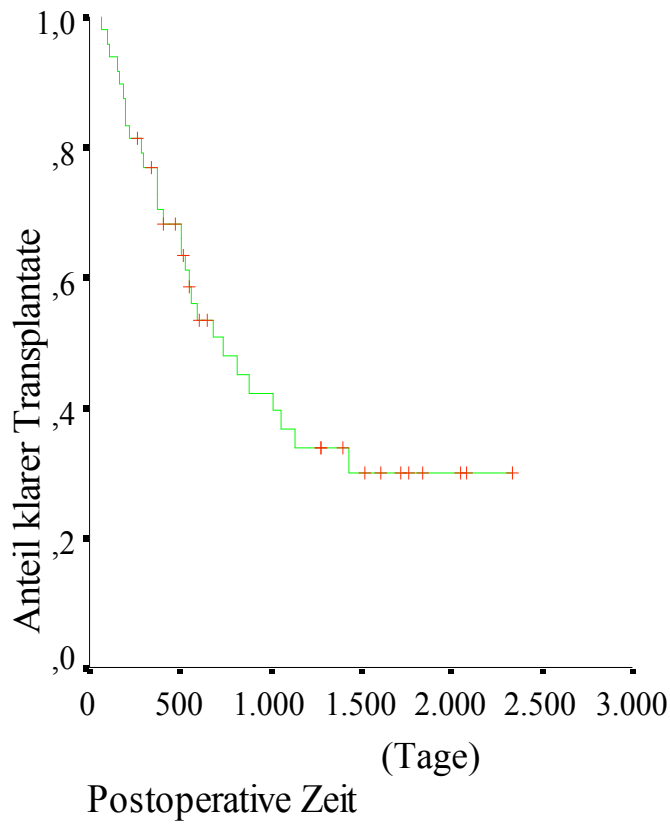
**Abbildung 17:** Komplette Konjunktivalisierung der Hornhaut einer Patientin mit Pseudophimoid.



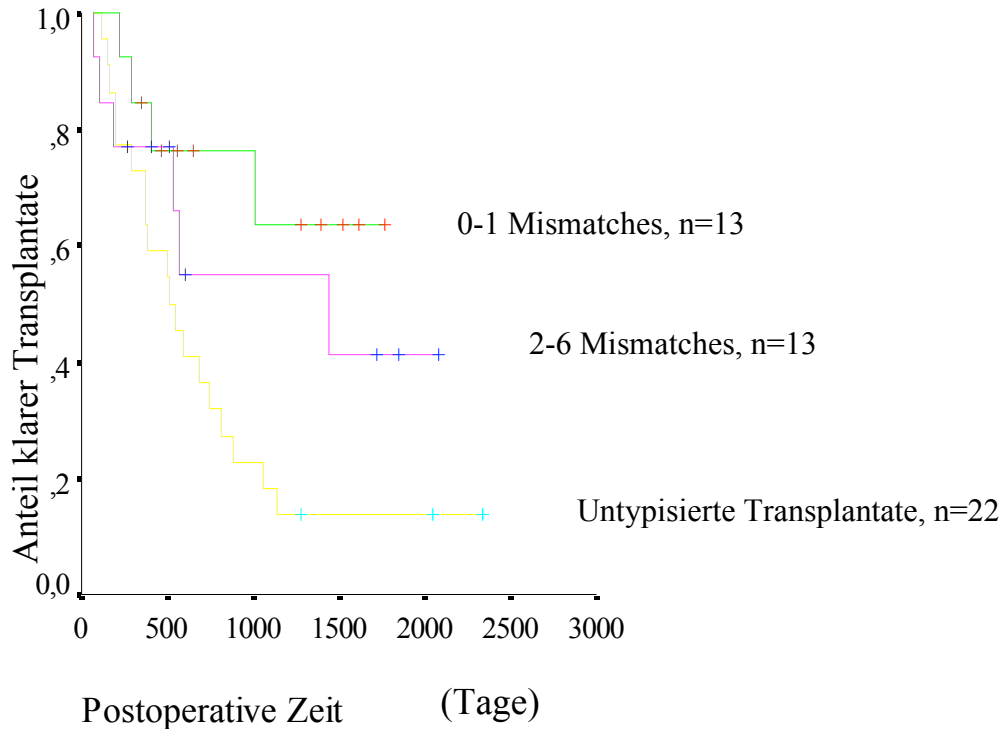
**Abbildung 18:** Auge derselben Patientin im Zustand nach homologer perforierender Limbo-Keratoplastik 52 Monate postoperativ. Die fortlaufenden Nähte sind noch nicht entfernt.



**Abbildung 19:** Überlebensanalyse der klaren Transplantate nach Kaplan und Meier.



**Abbildung 20:** Überlebensanalyse der klaren Transplantate nach Kaplan und Meier unter Berücksichtigung des HLA-Matching (Log-Rank-Test  $p=0,03$ ).



### 3.2 Ursachen des Transplantatversagens

Insgesamt versagten 29 von den 48 Transplantaten. Die Hauptursache des Versagens stellte die Oberflächenstörung der Transplantate dar, die bei 16 Patienten der Grund der Eintrübung war. Des Weiteren hatten 5 Transplantate wegen endothelialen Immunreaktionen und chronischem Endothelzellverlustes versagt. Bei 8 Patienten blieben die Trübungsursachen unklar. Das Versagen der Transplantate ereignete sich nach einer Zeit von  $501 \pm 351$  Tagen nach dem operativen Eingriff.

Die Trübungsursachen werden im Vergleich zum HLA-Matching in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,005$ ).

**Tabelle 8:** Trübungsursachen der Transplantate in Korrelation mit dem HLA-Matching.

		HLA-Mismatches			Gesamt
		0-1 MM	2-6 MM	Untypisiert	
Trübungsursache	klares Transplantat	9	7	3	19
	Abstoßung	2	0	2	4
	Epithelheilungsstörung	0	3	13	16
	Endothelerschöpfung	1	0	0	1
	Unklar	1	3	4	8
Gesamt		13	13	22	48

### 3.3 Verteilung der Immunreaktionen

Während der Nachbeobachtungszeit registrierten wir bei 18 von den 48 Transplantaten der Studie keine Abstoßungsreaktion. Von den anderen 30 Transplantaten litten 18 Transplantate an einer endothelialen, 3 an einer epithelialen, 2 an einer endo- und epithelialen, 2 an einer endothelialen und stromalen, 4 an einer Immunreaktion gegen den Limbus und 1 Transplantat an einer endothelialen und gegen den Limbus gerichteten Immunreaktion. Die immunologischen Reaktionen gegen den Limbus waren durch Veränderungen an den Limbusgefäßen gekennzeichnet, die eine Gefäßverdickung, Verlangsamung des Blutstromes, dunklere Gefäßfarbe und eine vermehrte Gefäßschlängelung darstellten. Sie konnten durch das Auftreten von inflammatorischen Zeichen und leichten oder schweren Oberflächenstörungen klinisch verifiziert werden (Tsai 1994).

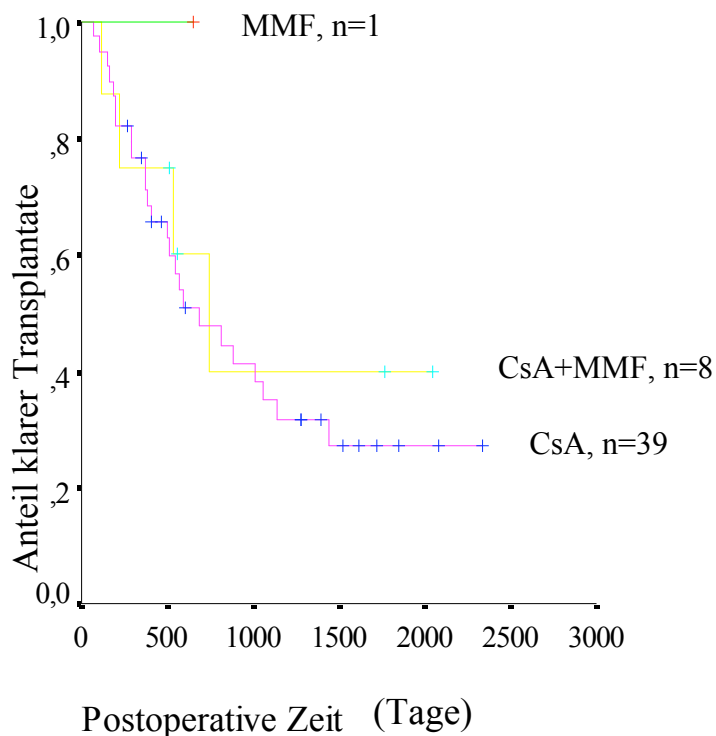
Die Anzahl der Immunreaktionen während der systemischen CsA-Immunsuppression betrug 28, nach Beendigung der CsA-Therapie 1.

Unter der MMF-Prophylaxe trat 1 Immunreaktion auf. Es handelte sich um den Patienten, der kein CsA bekommen hatte.

### 3.4 Systemische Immunsuppression

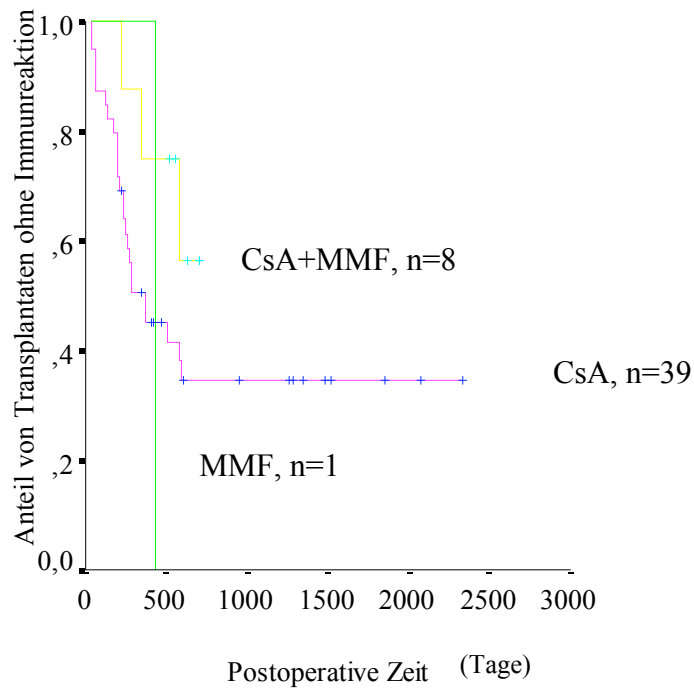
In dieser Studie wurden 39 Patienten ausschließlich mit CsA, 1 Patient ausschließlich mit MMF und 8 Patienten mit CsA und MMF behandelt. Im folgenden wird das Überleben der Transplantate unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Immunsuppression analysiert.

**Abbildung 21:** Überlebensanalyse der Transplantate nach Kaplan und Meier unter Berücksichtigung der systemischen Immunsuppression (Log-Rank-Test,  $p > 0,05$ ).



Der Anteil der klaren Transplantate von den Patienten, die eine immunsuppressive Kombination von Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil erhielten, ist höher als der Anteil der klaren Transplantate von den Patienten, bei denen nur Cyclosporin A verabreicht wurde. Jedoch ist diese tendenzielle Verbesserung der Überlebensprognose der Transplantate unter kombinierter Immunsuppression statistisch nicht signifikant (Log-Rank-Test,  $p > 0,05$ ). Ursache dafür ist möglicherweise die kleine Anzahl der untersuchten Fälle.

**Abbildung 22:** Überlebensanalyse der Transplantate nach Kaplan und Meier unter Berücksichtigung der Immunsuppression und des Auftretens von Immunreaktionen (Log-Rank-Test,  $p > 0,05$ ).

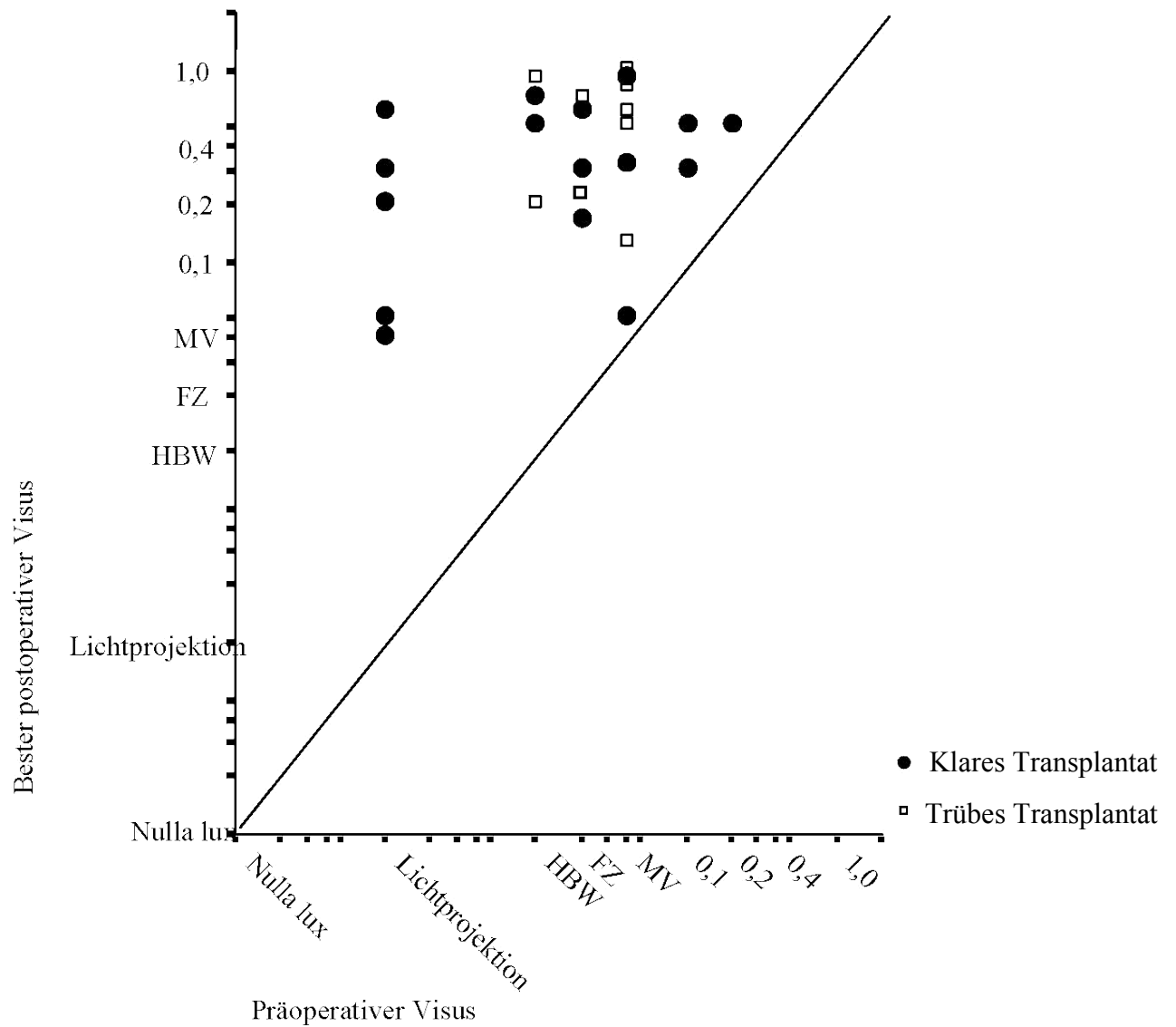


Die Überlebensanalyse der Transplantate nach Kaplan und Meier unter Berücksichtigung der Zeit bis zum Auftreten einer Immunreaktion zeigt, dass Patienten, die eine kombinierte Immunsuppressionstherapie mit Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil erhielten, eine tendenziell bessere Prognose haben als Patienten, bei denen ausschließlich nur Cyclosporin A als Monoprophylaxe eingesetzt wurde. Dieses Ergebnis hat jedoch keine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ).

### 3.5 Visusprognose

Der postoperative Visus war im Vergleich zum präoperativen Visus besser, solange die Transplantate klar blieben. Der präoperative Visus der Patienten mit klarem Transplantat konnte von  $0,02 \pm 0,07$  auf  $0,24 \pm 0,31$  gesteigert werden (letzte Untersuchung). Der beste Visus dieser Patienten war  $0,45 \pm 0,29$  und konnte in einer Zeit von  $797 \pm 704$  Tagen postoperativ gemessen werden. Bei den Patienten mit einem eingetrübten Transplantat konnte eine Verbesserung des Visus von  $0,02 \pm 0,05$  zu  $0,03 \pm 0,09$  in der letzten Untersuchung festgestellt werden. Der beste Visus bei den Patienten mit eingetrübtem Transplantat war  $0,26 \pm 0,31$  und wurde  $367 \pm 455$  Tage postoperativ beobachtet. 10 von den 29 Patienten mit eingetrübtem Transplantat konnten weiter von der Limbo-Keratoplastik profitieren, wie die letzte Untersuchung verdeutlichte. In der gesamten Gruppe verbesserte sich der Visus von  $0,02 \pm 0,06$  zu  $0,11 \pm 0,23$  bei der letzten klinischen Untersuchung. Der beste Visus war  $0,34 \pm 0,31$  und wurde nach  $537 \pm 599$  Tagen postoperativ beobachtet.

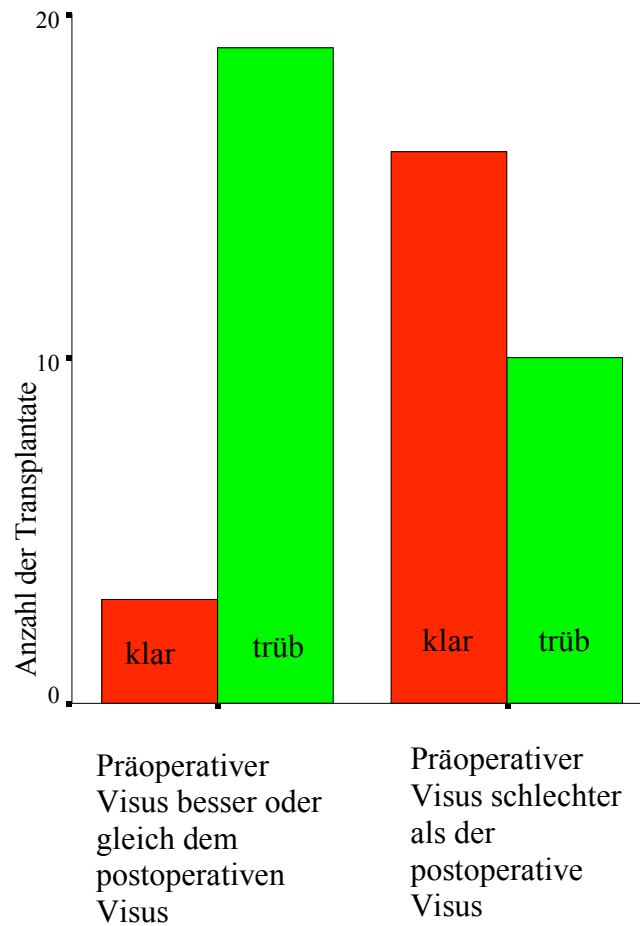
**Abbildung 23:** Graphische Darstellung des präoperativen und besten postoperativen Visus. (MV= Metervisus, FZ= Fingerzählen, HBW= Handbewegungen, LSP= Lichtscheinprojektion).





**Abbildung 24:** Verteilung der klaren und trüben Transplantate, bei denen der letzte postoperative Visus besser oder schlechter als der präoperative Visus war.

10 von den 29 Patienten mit eingetrübtem Transplantat konnten von der Keratoplastik durch eine Visusverbesserung profitieren.



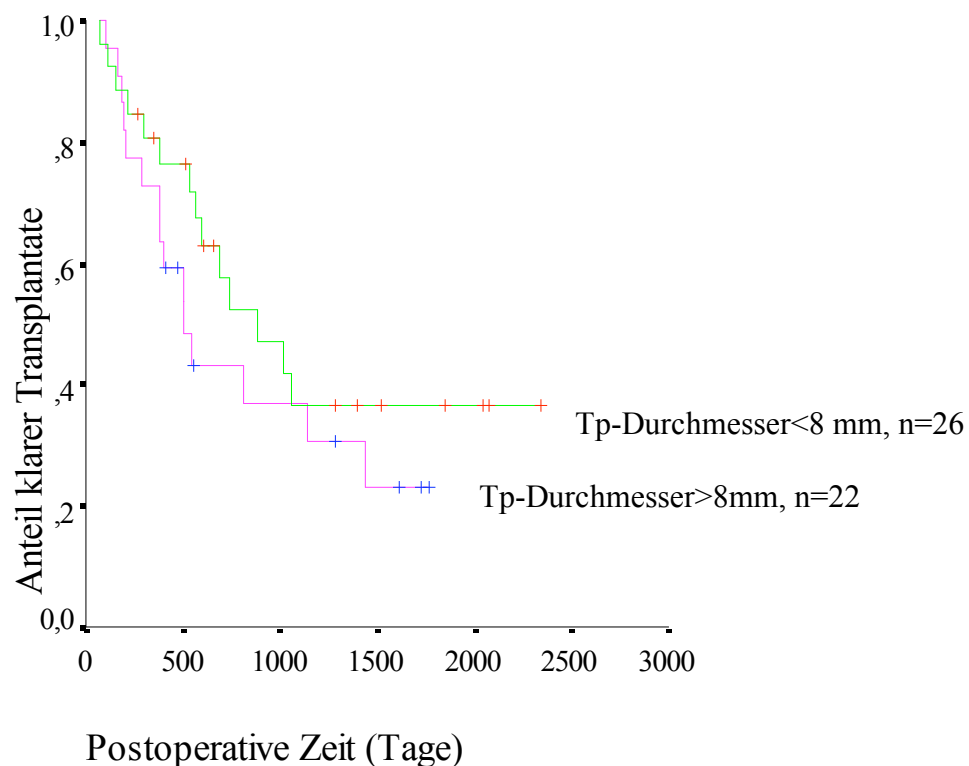
		Transplantat		Gesamt
		klar	trüb	
besserer Visus (Vpostop>Vpräop)	Nein	3	19	22
	Ja	16	10	26
Gesamt		19	29	48

Chi-Quadrat-Test, p=0,001

### 3.6 Überlebensprognose im Vergleich zum Transplantatdurchmesser

Bei den 48 durchgeführten Keratoplastiken wurden für die Transplantattrepanation während der Operation überwiegend Trepane der Größe 7,7mm gewählt, das bedeutet: bei insgesamt 26 von 48 Trepanationen oder in 54,2% der Fälle. Die Zahl der Transplantate mit einem größeren Durchmesser lag bei 22.

**Abbildung 25:** Überlebensanalyse der klaren Transplantate nach Kaplan und Meier unter Berücksichtigung des Transplantatdurchmessers (Log-Rank-Test,  $p=0,27$ ).



Transplantate mit einem Durchmesser von bis zu 8 mm (26 Patienten) hatten eine bessere Prognose als Transplantate mit einem Durchmesser von über 8 mm (22 Patienten), jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Log-Rank-Test,  $p>0,05$ ).

### **3.7 Immunogenetische Analyse**

Es wurden 9 Zellproben von den transplantierten Hornhäuten entnommen. Bei 7 dieser Proben konnten mittels Genanalyse eindeutige Befunde erhoben werden. Die Analyse des Genoms der extrahierten Zellen aus der Hornhaut der 6 Patienten mit einem klaren Transplantatbefund ergab eine Mischung aus Spender- und Empfängerzellen in einer Nachbeobachtungszeit von 27,6 +/- 19,5 (12-56) Monaten. Bei einem Patienten mit klarem Transplantat erschien nur das Genom des Empfängers. Bei dem Patient mit dem trüben Transplantat war nur das Genom des Empfängers präsent. Detaillierte Informationen zu den 7 Patienten können der Tabelle 9 entnommen werden.

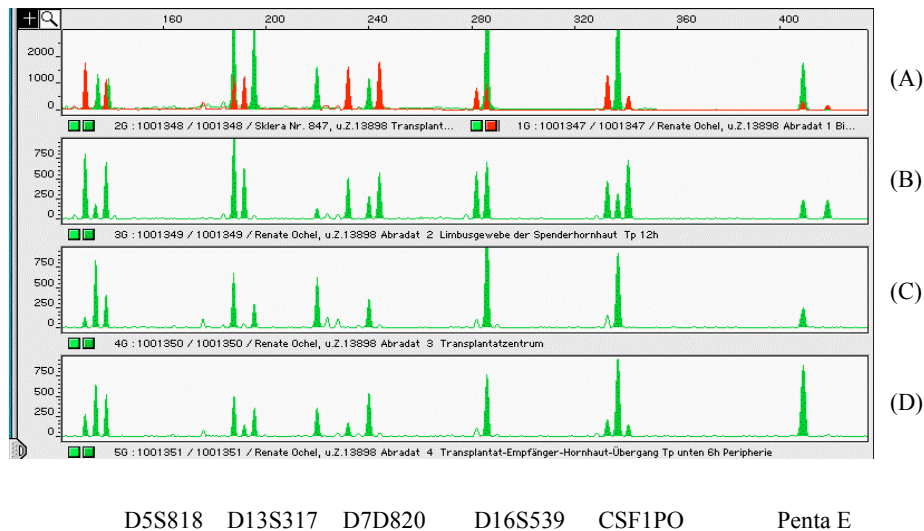
**Tabelle 9:** Dateien der Patienten, bei denen die immunogenetische Analyse durchgeführt wurde.

Identifikation	Alter	Genus	Indikation zur Limbo-Keratoplastik	Transplantat	Follow up (Monate)	HLA-Typisierung Spender/Empfänger	Immunsuppression (Monate)	Zellenherkunft
OR	44	f	Idiopathische Limbusinsuffizienz	klar	13	A2 B12,15 DR4,6/ A2 B5,40 DR4,6 2 Mismatches	CsA, 16 Monate	Spender und Empfänger
PG	41	f	Chronische Blepharokonjunktivitis	klar	13	A2,11 B15,15 DR4,6/ A2,11 B15,35 DR4,6 1 Mismatch	MMF, 14 Monate	Spender und Empfänger
OM	52	m	Verätzung	klar	14	A2,9 B7,12 DR1,2/ A2,9 B7,18 DR2 2 Mismatches	CsA, 15 Monate	Spender und Empfänger
DD	57	m	Verätzung	klar	15	Keine HLA-Typisierung	CsA, 14 Monate. MMF, 5 Monate	Spender und Empfänger
KG	51	f	Chronische Blepharokonjunktivitis	klar	56	A1,2 B8,15 DR13,16/ A2,9 B2,27 DR1,8 5 Mismatches	CsA, 15 Monate	Spender und Empfänger
EE	54	f	Okuläres Pemphigoid	klar	28	A2,10 B15,17 DR2,7/ A2,10 B15,17 DR2,7 0 Mismatches	CsA, 38 Monate	Empfänger
BK	34	m	Verätzung	getrübt	54	A2 B40 DR1,5/ A2,11 B40,22 DR 4,5 1 Mismatch	CsA, 16 Monate	Empfänger

Anmerkung: Die 4 Patienten, bei denen die Immunsuppression länger als das follow-up dauerte, wurden schon präoperativ mit systemischen CsA oder MMF behandelt. Der Patient EE wurde präoperativ wegen des okulären Pemphigoids mit CsA behandelt.

## Abbildung 26: Molekulargenetische Analyse von Patienten- und Spenderzellen

Grafische Darstellung der Allele von 6 exemplarischen Genloci (Patient OR mit klarem Transplantat, 6 short-tandem-repeat loci).



A: Grün= Sklerazellen des Spenders, Rot= Bindehautzellen des Empfängers.

B: Zellen vom Limbus des Transplantates mit Spender/Empfänger-DNA.

C: Zellen aus dem Zentrum des Transplantates mit Spender-DNA.

D: Zellen am Rand des Transplantates gegenüber vom Limbus mit überwiegend Spender-DNA.

In der Abbildung 26 wird die graphische Darstellung der Allele von 6 exemplarischen Loci einer Patientin präsentiert. Bei der 45-jährigen Patientin wurde ein Jahr vor der Bürstenabrasio der Hornhaut für die Gewinnung der Zellen eine Limbo-Keratoplastik vorgenommen. Bis zum Zeitpunkt der Zellentnahme wurde keine Immunreaktion beobachtet, das Transplantat war klar und der Zustand des Limbus unter spaltlampenmikroskopischer Untersuchung zufriedenstellend. Nach der Bürstenabrasio wurden keine Komplikationen des Transplantates festgestellt. Die Patientin wurde zur Zellentnahme mit CsA behandelt. In der Abbildung 26 (A) werden die Allele von 6 exemplarischen Genloci aus Zellen, die der Bindehaut der Patientin entstammen, mit rot graphisch dargestellt. In derselben Skizze werden mit grün die Allele von den 6 Genloci aus der Sklera des Spenders abgebildet. Mit Hilfe der molekulargenetischen Analyse

dieser Bindehautzellen wurde die Herkunft der weiteren Zellproben aus verschiedenen Stellen der transplantierten Hornhaut bestimmt. In der Abbildung 26 (B) werden graphisch die Allele von den 6 STR-Loci, die aus dem bei 12 Uhr transplantierten Limbus stammen, dargestellt. Die Analyse ergibt eine Mischung aus Zellen des Spenders und des Empfängers. In der Abbildung 26 (C) werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse der Zellen, die vom Zentrum des Transplantates gewonnen wurden, dargestellt. Diese Zellen entstammen dem Spender. Die Allele der 6 STR-Loci, die in der Abbildung 26 (D) geschildert werden, stammen aus Zellen, die aus der Stelle des Transplantates gegenüber des Limbus bei 6 Uhr peripher gewonnen wurden. Bei diesen Zellen erschien eine Mischung des Genoms des Spenders und des Empfängers.

### **3.8 Nebenwirkungen der systemischen Immusuppression**

In dieser Studie wurden 39 Patienten ausschließlich mit CsA, 1 Patient ausschließlich mit MMF und 8 Patienten mit CsA und MMF behandelt. Als Nebenwirkungen der systemischen Immunsuppression wurden bei 9 Patienten ein Kreatininanstieg, bei 6 Patienten eine Erhöhung der Werte der Leberenzyme, bei 5 Patienten ein Blutdruckanstieg und bei 2 Patienten weitere Nebenwirkungen beobachtet (Bei einem Patienten CsA induzierter Tremor und bei einem anderen Harnsäureanstieg). Doch keine unerwünschte Wirkung zwang dazu, die immunsuppressive Therapie abzusetzen oder zu reduzieren.

## 4 Diskussion

Die Hornhauttransplantation gehört zu den erfolgreichsten Transplantationen (Williams 1995). Anders als bei der Transplantation von soliden Organen braucht man bei der Mehrheit der Patienten keine systemische immunsuppressive Behandlung, um einer Transplantatabstoßung vorzubeugen (Vail 1994). In avaskulären Hornhäuten beträgt die Überlebensprognose der Transplantate nach homologer konventioneller Keratoplastik 85-95% nach einem Jahr (Williams 1995, Vail 1997, Vabres 1999). Immunologische Reaktionen stellen jedoch weiterhin in den meisten Studien die Hauptursache des Transplantatversagens dar (Vail 1996, Vail 1997, Vabres 1999, Khodadoust 1973). Die Inzidenz der immunologisch bedingten Abstoßungsreaktion ist bei Hochrisiko-Keratoplastiken stark erhöht (Völker-Dieben 1982, Williams 1992, Boisjoly 1993, Reinhard 1996, Hill 1994). Die Limbo-Keratoplastik gehört unter anderem wegen der Transplantation der Limbusstammzellen zu den Hochrisiko-Keratoplastiken. Ein wesentlicher Grund ist, dass der Limbus wegen der in ihm erhaltenen zahlreichen Langerhans-Zellen immunstimulierend wirkt, so dass sich wahrscheinlich keine ACAID ausbilden kann. Eine tiefe Wirtshornhautvaskularisation trägt auch zum erhöhten Risiko einer immunologischen Abstoßung bei. Außerdem wird das Ergebnis der Limbo-Keratoplastik durch Risikofaktoren beeinflusst, die das Auftreten einer Immunreaktion begünstigen, wie unter anderem schwere Epithelheilungsstörungen. Die Störungen der Transplantatoberfläche gehen auf die pathologische Lidkanten-, Bindehaut- und Tränensituation zurück.

Erste Analysen der Langzeitprognose der homologen perforierenden Limbo-Keratoplastik ergaben 3 Jahre postoperativ einen Anteil klarer Transplantate von 18% (Reinhard 1999, Sundmacher 1996, Sundmacher 1997). Als Grund dieser schlechten Prognose wurde eine trotz systemischer CsA-Applikation auftretende progressive Immundestruktion des transplantierten Limbus vermutet (Sundmacher 1997).

In dieser Studie wurden 48 homologe perforierende Limbo-Keratoplastiken durchgeführt, um schwere Oberflächenstörungen von limbalen Insuffizienz verschiedener Ätiologien (in den meisten Fällen sekundäre Limbusstammzellinsuffizienz) zu rekonstruieren. Alle Patienten hatten präoperativ einen sehr schlechten Visus und konnten durch eine herkömmliche Operation nicht rehabilitiert werden.

Das Überleben der Transplantate sollte durch die Verabreichung von systemischem CsA für eine begrenzte Dauer, in den meisten Fällen von 6 Monaten, bei konventionellen perforierenden Risiko-Hornhauttransplantationen erheblich verlängert werden (Reinhard 1997). Diese Immunprophylaxe scheint jedoch bei der Mehrzahl der Patienten mit totaler Limbusstammzellinsuffizienz unzureichend zu sein. Möglicherweise müssen die gleichen Maßnahmen wie bei einer Organtransplantation getroffen werden. Die Verwendung von HLA-gematchten Transplantaten und eine Kombination von systemischen Immunsuppressiva.

#### **4.1 HLA-Matching**

Major histocompatibility complex (MHC) Antigene, dauerhaft exprimiert in allen kernhaltigen Zellen (HLA-Klasse I) oder nur in bestimmten Immunzellen, beispielsweise Antigen-präsentierenden Zellen (HLA-Klasse II), sind wegen ihrer führenden Rolle in der Transplantatabstoßung klinisch sehr von Bedeutung. Wenn die Spenderzellen, die HLA-Klasse I Antigene enthalten, für die HLA-A oder die HLA-B Loci Mismatches mit den Empfängerzellen darstellen, könnten sie Ziel von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen des Empfängers sein (Creemers 1999, Pels 1984, Roelen 1995). Wenn die Spenderzellen, die HLA-Klasse II Antigene enthalten, für den HLA-DR Locus untypisiert sind, dann könnten die CD4<sup>+</sup> Helfer-Lymphozyten des Empfängers eine verzögerte hypersensitive Reaktion auslösen. Studien, die sich für viele Jahre mit dem möglichen profitierenden Effekt des HLA-Matching in der Hornhauttransplantation beschäftigten, haben kontroverse Ergebnisse gezeigt (Bagessen 1996, Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group 1992, Munkhbat 1999). Zwei Gründe können dafür genannt werden:

1. Die Expression von Antigenen der Klasse I und II in der Hornhaut war lange Zeit umstritten. Streilein (1995) identifizierte die geringe Expression von HLA-Klasse I und II als einen Grund des immunologischen Privilegs der Hornhaut. Newsome und Mitarbeiter (1974) beobachteten die Anwesenheit von Klasse I Antigenen in epithelialen, stromalen und endothelialen Hornhautzellen. Man vermutete, dass sich Klasse II Antigene regelmäßig nur in Langerhans Zellen befinden (Jager 1992). In vorausgehenden Studien wurden solche Langerhans Zellen nur im peripheren Hornhautepithel dargestellt (Jager 1992). In den meisten Fällen sind sie mit einem



perforierenden Transplantat nicht mittransplantiert, wenn Durchmesser von bis 8 mm verwendet werden. Des Weiteren können sie mit der oberflächlichen epithelialen Schicht eliminiert sein, wenn das Transplantat in Organkultur aufbewahrt wird (wie die meisten Transplantate in der vorliegenden Studie) (Jager 1992).

Vor Kurzem zeigten Hamrah und Mitarbeiter (2002) in einer experimentellen Studie, dass dendritische (=Langerhans) Zellen und 2 weitere Subpopulationen von Myelin-abstammenden (antigenpräsentierenden) Zellen im peripheren und im zentralen anterioren und posterioren Stroma nachgewiesen wurden. Solche Zellen können durch eine perforierende Transplantation mittransplantiert werden.

In einer weiteren experimentellen Studie schafften es Liu und Mitarbeiter (2002), Klasse II positive dendritische Zellen des Spenders im drainierenden Lymphknoten des Empfängers nachzuweisen. Mittlerweile ist unumstritten, dass sowohl Klasse I als auch Klasse II HLA in kornealen Zellen nachweisbar sind und mittransplantiert werden können.

2. Frühere klinische Studien zeigten umstrittene Ergebnisse bezüglich des HLA-Matching (Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group 1992, Hill JC 1997). Die Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group konnte nicht nachweisen dass, das HLA Matching einen Einfluß auf das Transplantatüberleben hat. Die Forschungsgruppe hat eine Erklärung in einer weiteren Veröffentlichung gegeben (Hopkins 1992). Die Ursache für den fehlenden Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Transplantatüberleben und HLA-Matching ist in der verwendeten technischen Methode für die serologische Typisierung der HLA-Klasse I begründet, die sich als unpräzise herausstellte. In dieser Studie wurde darüber berichtet, dass eine erneute Typisierung der HLA-Klasse I und II Antigene solche Ergebnisse ergab, die wenig Ähnlichkeiten mit den Ausgangsergebnissen zeigten. In der Zwischenzeit sind neue erfolgreichere Methoden zur HLA-Typisierung etabliert (Wernet 1998). Darauf basierend weisen neue Studien den positiven Effekt der HLA-Typisierung sowohl bei Normalrisiko- als auch bei Hochrisiko-Keratoplastiken nach (Völkler-Dieben 2000, Khaireddin 2003, Bartels 2001, Reinhard 2004).

In dieser Studie wurde die Beeinflussung des HLA-Klasse I und II Matching in der Langzeitprognose der homologen Limbo-Keratoplastik bei Patienten mit totaler Limbusstammzellinsuffizienz untersucht. Transplantate mit wenigen Mismatches (0-1

Mismatches in den HLA-A, -B und -DR Loci) hatten eine viel bessere Prognose als Transplantate mit mehr Mismatches (2-6 Mismatches in den HLA-A, -B und -DR Loci) oder als untypisierte Transplantate. Das Transplantatüberleben zwischen diesen Gruppen ergab statistisch signifikante Unterschiede in dem Log-Rank- und Chi-Quadrat-Test. Die Transplantatgruppe mit 0-1 Mismatches hatte die beste Überlebensprognose gefolgt von den Transplantaten mit 2-6 Mismatches. Die ungematchte Transplantate erwiesen die schlechteste Prognose.

Eine weitere Verbesserung der Transplantatprognose könnte möglicherweise erzielt werden, wenn weitere HLA (Major) Loci (C Locus in der HLA-Klasse I oder DQ Locus in der HLA- Klasse II), HLA-Split-Antigene und Minor-Antigene berücksichtigt werden. In dieser Studie wurden nur Broad HLA Antigene beachtet. Über den Einfluss von Split-HLA auf das Transplantatüberleben berichten Beekhuis et al. 2003. Sie reevaluierten retrospektiv 303 Hoch-Risiko Patienten nach ihren Broad- und Split-Mismatches. Sie fanden heraus, dass HLA-Split- gegenüber HLA-Broad-Matching hinsichtlich der Langzeitprognose der Hornhauttransplantate vor allem bei follow-up Perioden von 3 bis 4 Jahre von Vorteil ist. Khairuddin (2003) in seiner Studie konnte keine signifikante Beeinflussung des HLA-Split-Matching zur Prognose der Hornhauttransplantate beweisen. Der Autor begründet dieses Ergebnis durch den Mangel an korrekten HLA-Split Daten. Die verwendete serologische Typisierungsmethoden bis Anfang der 90er Jahre lieferten zuverlässige Ergebnisse für Broad- aber nicht für Split-Antigene.

#### **4.2 Immunogenetische Analyse**

Nach einer herkömmlichen perforierenden Keratoplastik wurde nachgewiesen, dass Spender-Hornhautepithelzellen meist innerhalb eines Jahres postoperativ von Empfänger-Hornhautepithelzellen ersetzt werden (Kinoshita 1981, Kobayashi 1995). Doch es ist nicht offensichtlich, ob und wie lange Limbusstammzellen, die vom Empfänger stammen, auf dem Transplantat und/oder der Wirtshornhaut überleben. In dieser Studie wurden short-tandem-repeat DNA-Analysen von 7 Epithelzellentnahmen aus Patienten durchgeführt, bei denen eine homologe zentrale Limbo-Keratoplastik eingesetzt wurde. Fünf von den sechs Proben aus den klaren Transplantaten ergaben eine Mischung aus Spender- und Empfängergewebe und bei einer Probe eines klaren Transplantates erschien nur das

Genom des Empfängers. Die Epithelzellentnahme fand in einer Nachbeobachtungszeit von 27,6 +/- 19,5 Monaten statt.

Das mit dem Spender übereinstimmende genetische Muster der Epithelien auf dem transplantierten Hornhaut-Limbus-Transplantat bei intaktem Limbus beweist in diesen 5 Patienten das langfristige Überleben der transplantierten Limbusstammzellen bei Verwendung von HLA-gematchten Transplantaten und bei ausreichender immunsuppressiver Therapie.

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit dem Überleben der Spenderstammzellen. Einerseits berichten Williams 1995 und Swift 1996, dass die Limbusstammzellen des Empfängers nach einer homologen Limbustransplantation nicht überleben können. Williams 1995 verwendet short-tandem-repeat DNA-Analyse und Swift 1996 Geschlechts-Chromatin-Analyse im Tiermodell.

Stenevi und Mitarbeiter (2002) teilen andererseits über den Fall eines männlichen Patienten, bei dem nach chemischer Verätzung und nach mehreren gescheiterten Hornhauttransplantationen eine Hornhauttransplantation mit Limbusstammzellen durchgeführt wurde, mit. Der Spender war eine Frau. Drei Jahre nach dem Eingriff und bei klinisch klarem Transplantat konnten mittels Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) Epithelzellen weiblicher Herkunft nachgewiesen werden. Die Epithelzellen weiblicher Herkunft betragen 30% aller Epithelzellen. Der übrige Anteil an Epithelzellen war männlicher Herkunft. Der Fall lässt offenbar werden, dass eine Minderheit (30%) von gesunden transplantierten Stammzellen für ein klares Transplantat mit klinisch gesunder Hornhautoberfläche ausreichend ist. Shimazaki (1999) befasste sich ebenfalls mit dem Überleben von transplantierten Limbusstammzellen an 10 Augen. Er verwendete ringförmige Limbustransplantate. Mittels Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) von Geschlechtschromatin analysierte er 5 Augen, bei denen sich das Geschlecht des Empfängers vom Spender unterschied. Bei 2 Augen fand er nur Epithelzellen des Spenders, bei 2 Augen Zellen des Empfängers und bei 1 eine Mischung von Spender- und Empfängerepithelien. In derselben Studie konnten mittels „polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism“ (PCR-RFLP von HLA-DPB1-Allelen) 9 Augen untersucht werden. Bei 4 von ihnen wurden Epithelien vom Spender nachgewiesen, bei 3 Augen ein Mosaik aus Spender- und Empfängerzellen und bei 2 nur Empfängerepithelien. Hille (2002) beschreibt den Fall eines Patienten, bei dem eine tief lamellierende Hornhaut-Limbus-Transplantation nach einer schweren Verätzung mit

Zerstörung der Bowman-Membran zur Vorbereitung einer perforierenden Keratoplastik vorgenommen wurde. Anlässlich der später durchgeführten Keratoplastik wurden die Epithel- und Endothelzellen der entnommenen Hornhautscheibe molekulargenetisch untersucht. Die genetische Analyse erfolgte nach Amplifizierung der DNA mittels Polymerase-Chain-Reaktion in einem DNA-Sequenzier. Die zur Analyse entnommenen Epithelzellen zeigten in allen getesteten Genloci keine Übereinstimmung mit den Empfängerzellen und mussten somit von den transplantierten Stammzellen des Spenders stammen. Der größte Vorteil einer lamellierenden Hornhaut-Limbus-Transplantation liegt darin, dass die nicht entfernte Descemet-Membran des Empfänger Auges eine endotheliale Abstoßung vermeidet. Somit wird die Überlebensprognose des Transplantates verbessert, da eine wesentliche Bedrohung des Transplantates wegfällt.

Henderson und Mitarbeiter wiesen in ihrer Studie 1997 mittels DNA Polymorphismus und Amelogenin-Genanalyse bei einem Patienten mit kongenitaler Aniridie zweieinhalb Jahre nach der Durchführung einer Limbo-Keratoplastik Spenderzellen nach, die zu mehr als 90% vom Empfänger stammten. Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis ihrer Studie von 2001. Dabei wurde nach Spender-Limbusstammzellen einer heterogenen Gruppe von 5 Patienten gesucht, bei denen vor 3 bis 5 Jahren eine homologe Limbo-Keratoplastik (4 Patienten) oder eine homologe tarsokonjunktivale Transplantation (1 Patient) vorgenommen wurde. Die Zellen wurden mittels Impressionszytologie von der Transplantatoberfläche gewonnen und durch DNA Fingerprinting mit Untersuchung variabler „nucleotid tandem repeat“ Sequenzen analysiert. Obwohl in 4 von 5 Fällen eine objektive und subjektive Verbesserung beobachtet wurde, waren keine Spenderzellen nachweisbar. Die Autoren schlossen daraus, dass Stammzellen, die vom Spender stammen, nicht unbedingt durch eine Repopulation die Hornhautoberfläche stabilisieren. Möglicherweise begünstigt das Spenderstroma die Regenerierung der residualen Stammzellen des Empfängers. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich die Spenderstammzellen in diesem Fall im basalen Epithel befanden und in der Probe nicht gewonnen wurden.

Eine zusätzliche Verbesserung der Ergebnisse wird sich voraussichtlich durch eine weitere Optimierung der Matching-Strategien und der Immunsuppression erreichen lassen.

### 4.3 Immunsuppression

Die Immunsuppression ist ein anderer entscheidender Parameter für die Verbesserung der Prognose der Limbo-Keratoplastik.

In dieser Studie wurden 8 Patienten mit einer Kombination aus Cyclosporin A und MMF immunsupprimiert. Doch ist diese Patientengruppe zu klein, um eine statistische Analyse durchzuführen und ausschlaggebende Ergebnisse herauszubekommen.

Der Nutzen von systemischem Cyclosporin A als potentes Medikament zur Reduktion des Risikos für Immunreaktionen nach Organtransplantation ist eindeutig erwiesen (Land 1987). Die Effektivität von Cyclosporin A in der Immunprophylaxe nach Hochrisiko-Keratoplastik wurde in mehreren experimentellen (Kruse 1991, Coupland 1994) und klinischen (Hill 1989, 1994, Reinhard 1997) Studien überprüft. Durch die Verwendung von systemischem Cyclosporin A kommt es zu einem deutlichen Rückgang des Transplantatversagens nach Hochrisiko-Keratoplastik (Reinhard 1996). In der vorliegenden Studie waren die meisten Abstoßungsreaktionen unter Immunsuppression nämlich reversibel und Ursache des Transplantatversagens in nur 4 von 29 Fällen. Diese Therapie geht jedoch mit einer relativ hohen Inzidenz an unerwünschten Nebenwirkungen einher, die annähernd 10% der Patienten zu vorzeitigem Absetzen des Medikamentes zwingen (Reinhard 1997). In dieser Studie erschien meistens ein Kreatininanstieg als Hauptnebenwirkung von CsA, gefolgt von einem Leberenzymanstieg. Ein vorzeitiges Absetzen des Cyclosporin A war jedoch nicht nötig. Neben der relativ hohen Nebenwirkungsrate hat Cyclosporin A noch einen entscheidenden Nachteil, nämlich die Notwendigkeit der blutspiegeladaptierten Dosierung. Wegen der unsicheren Bioverfügbarkeit und der daraus resultierender großer Variabilität der benötigten Dosis erfolgt die Therapie mit Cyclosporin A unter fortlaufender CsA-Blutspiegelkontrolle. Die CsA-Dosierung ist also mit einem arbeits- und kostenintensiven Follow-up durch das notwendige regelmäßige Drug-monitoring verbunden.

Mills, Coster und Williams berichten 2002 von dem Einfluss der Immunsuppression auf das Überleben von Limbustammzellen in einem Modell von homologer Limbustransplantation bei der Ratte. Zur Immunsuppression wurden nach der Transplantation des Limbus CsA intramuskulär und Prednisolon lokal appliziert. Das Überleben der Transplantate bei der Gruppe der Ratten unter Immunsuppression war deutlich länger als bei den Ratten, die keine Immunsuppression erhielten, jedoch war

dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Am Ende zeigte sich in der Mehrzahl aller Fälle, dass die Transplantate egal ob mit oder ohne Immunsuppression behandelt von einer klinischen Abstoßungsreaktion betroffen waren. Diese Abstoßungsreaktion war von einem Transplantatödem und einer Ansammlung entzündlichen Infiltrates gekennzeichnet. Bei der immunhistochemischen Untersuchung wies das Infiltrat die Charakteristika einer verzögerten hypersensitiven Reaktion mit Vorkommen von aktivierten T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten auf und zeigte gleichzeitig eine Hyperexpression von MHC-Antigenen. Ein weiterer Aspekt dieser Studie betraf die Erforschung einer Korrelation zwischen dem klinischen Bild der Transplantate und dem Nachweis von Spenderzellen. Die immunogenetischen Analysen führten zu dem Ergebnis, dass bei fast allen Transplantaten nach der zweiten postoperativen Woche keine Spenderzellen identifiziert wurden. Das geschah auch bei Fällen, die keine Anzeichen einer Immunreaktion aufwiesen, was die Hypothese einer subklinischen Abstoßung des transplantierten Limbus verstärkt. Diese Vermutung ergibt sich auch bei klinischen Studien und führt zu einer bemerkenswert schlechten Prognose trotz Immunsuppression (Sundmacher 1997).

Daya et al. (2000) beschrieben die Abstoßung von 5 Transplantaten bei 4 Patienten, bei denen eine homologe Limbo-Keratoplastik durchgeführt wurde. Das Transplantatversagen wurde klinisch durch eine sektorielle Injektion, eine ödematöse und infiltrierende Veränderung des Transplantats beschrieben. Die Abstoßung wurde weiter auch histochemisch durch die Entdeckung von CD4 und CD8 T-Lymphozyten im Transplantatepithel bewiesen. So lässt sich schließen, dass das Bewahren der transplantierten limbalen Zellen vor der immunologischen Destruktion einen wichtigen postoperativen Parameter darstellt.

Die starke Immunstimulation durch den Limbus ist durch CsA nur partiell und auch nur solange aufzuhalten, wie dieses Mittel in relativ hoher Dosierung gegeben wird, was bei Hornhauttransplantationen nur ausnahmsweise langfristig vertretbar ist (Sundmacher 1997). Während man nach „einfachen“ Risiko-Keratoplastiken z.B. bei starker Vaskularisation der Hornhaut, aber erhaltener Limbusstammzellfunktion die Cyclosporin A Behandlung beenden und dann darauf bauen kann, dass das Immunprivileg des Ortes (ACAID) eine Partialtoleranz herbeiführt, die es dem Transplantat ermöglicht, auch ohne Cyclosporin A zu überleben, kann man dies bei Limbustransplantationen kaum erhoffen.

Die Forschung weiterer immunsuppressiver Methoden ist für die Verbesserung der Überlebensprognose wichtig. Studien wie von Dua (1999) deuten auf eine Effektivität von FK-506 in einer mittelfristigen Prognose nach homologer Limbo-Keratoplastik hin. Die kombinierte Immunprophylaxe mit systemisch appliziertem Rapamycin und Cyclosporin A oder Mycophenolate Mofetil ergab hervorragende Ergebnisse in Tierexperimenten (Reis 2000, Reis 2002).

## **5. Schlussfolgerung**

Insgesamt waren 19 von 48 Transplantaten (40%) 5 Jahre postoperativ bei Verwendung HLA-typisierter Transplantate und einer langfristigen lokalen und systemischen Immunsuppression zentral klar. Die beste Überlebensprognose hatten die gut gematchte Transplantate (0-1 Mismatches). Sie blieben in einem Anteil von 65% zentral klar. Das Transplantatüberleben mit zentral klarer Hornhaut korreliert mit dem Nachweis von Spenderepithelzellen auf dem Transplantat. Dies kann durch molekulargenetischen Nachweis von Spender-DNA auf dem Transplantat erfolgen, so wie uns dies in einer kleinen Gruppe von Patienten gelungen ist. Eine adäquate Typisierung kann das Risiko einer Immunreaktion vermindern, aber möglicherweise nicht eliminieren. Tritt trotzdem eine Immunreaktion auf, ist nach wie vor eine potente medikamentöse Immunmodulation notwendig. Wegen der Gefahr immunologischer Transplantatreaktionen ist bei der homologen zentralen Limbo-Keratoplastik eine unter Umständen lebenslange, mit potentiellen Nebenwirkungen behaftete immunsuppressive Therapie erforderlich. Eine weitere Verbesserung der Ergebnisse kann wahrscheinlich durch Optimierung der HLA-Typisierung und der Immunsuppressionstherapie sowie durch die Verwendung von Amnionmembran und ex vivo Expansionsverfahren erzielt werden.

## **6 Zusammenfassung**

Hintergrund: Die Transplantation des Limbus beruht auf der Theorie, dass zur Epithelialisierung und Aufrechterhaltung einer klaren Hornhaut limbale Stammzellen erforderlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Prognose der homologen perforierenden Limbo-Keratoplastik unter besonderer Berücksichtigung des HLA-Matching und der Immunsuppression dargestellt.

Patienten und Methoden: In der Studie wurden 48 Patienten mit der Diagnose der totalen Limbusstammzellinsuffizienz, bei denen eine homologe perforierende Limbo-Keratoplastik vorgenommen worden war, untersucht. Alle Patienten hatten systemisch Cyclosporin A und/oder Mycophenolat Mofetil postoperativ bekommen. 13 von ihnen hatten Transplantate mit 0-1 Mismatches in den HLA A, B und DR loci, 13 von ihnen Transplantate mit 2-6 Mismatches und 22 von ihnen untypisierte Transplantate erhalten. Bei 9 Patienten waren die Epithelzellen der transplantierten Hornhaut molekulargenetisch untersucht worden.

Ergebnisse: 5 Jahre postoperativ waren 65% der Transplantate mit 0-1 Mismatches, 41% der Transplantate mit 2-6 Mismatches und 14% der untypisierten Transplantate zentral klar (Auswertung nach Kaplan und Meier, Log-Rank-Test,  $p=0,03$ ). Immunogenetische Analysen konnten in 7 von 9 Zellproben durchgeführt werden und ergaben Spender-DNA im Hornhautepithel bei 5 von 7 Patienten nach 56 Monaten postoperativ.

Schlussfolgerungen: In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass durch eine homologe perforierende Limbo-Keratoplastik transplantierte Stammzellen langfristig unter Immunsuppression überleben können. Dieses Ergebnis konnte immunogenetisch untermauert werden. Das mit dem Spender übereinstimmende genetische Muster der Epithelien auf dem transplantierten Hornhaut-Limbus-Transplantat bei intaktem Limbus bestätigt das Überleben der transplantierten Limbusstammzellen. HLA-typisierte Transplantate scheinen eine bessere Prognose als untypisierte Transplantate zu zeigen. Fortschritte im Matching und in den medikamentösen immunmodulierenden Methoden könnten die aktuellen Ergebnisse weiter verbessern.



## **7 Abkürzungen**

ACAID: Anterior chamber immune deviation

CD: cluster of differentiation

CsA: Cyclosporin A

DNA: Desoxyribonukleinsäure

EGF-Rezeptor: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisation

HLA: Human Leukocyte Antigen

HLA-MM: HLA-Mismatches

KLAT: Keratolimbale Allograft

MHC: Major histocompatibility complex

MMF: Mycophenolat Mofetil

STR: Short tandem repeat

Tp: Transplantat

## **8 Literaturverzeichnis**

Adamis AP, Starck T, Kenyon KR (1990) The management of pterygium. *Ophthalmol Clin North Am* 3: 611-623

Alpek EK, Foster CS (1999) Limbal stem-cell transplantation. *Int Ophthalmol Clin* 39: 71-82

Allredge OC, Krachmer JH (1981) Clinical types of corneal transplant reaction. *Arch Ophthalmol* 99: 599-604

Arentsen JJ (1983) Corneal transplant allograft reaction: possible predisposing factors. *Trans Am Ophthalmol Soc* 81: 361-402

Bach M, Commerell G (1998) Sehschärfenbestimmung nach europäischer Norm: wissenschaftliche Grundlagen und Möglichkeiten der automatischen Messung. *Klin Monatsblätter für Augenheilkunde* 210:190-195

Baggesen K, Lamm LU, Ehlers N (1996) Significant effect of high resolution HLA-DRB1 matching in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 62: 1273-1277

Bartels M, Otten H, van Gelberen B, van der Lelij A (2001) Influence of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matching on rejection of random corneal grafts using corneal tissue for retrospective DNA HLA typing. *Br J Ophthalmol* 85: 1341-1346

Beekhuis WH, Bartels M, Doxiadis Il, van Rij G (2003) Degree of compatibility for HLA-A and -B effects outcome in high-risk corneal transplantation. *Dev Ophthalmol* 36: 12-21

Bodaghi B, Paques M, Bertini V (1994). Langerhans cells in human limbal conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 suppl: 167

Böhringer D, Reinhard T, Godehardt E, Sundmacher R (2001) Regressionsanalyse des idiopathischen Endothelzellverlustes nach perforierender Keratoplastik: Grundlage für die Langzeitanalyse von Endothelschädigungsfaktoren in einer retrospektiven Studie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 218:1-6

Böhringer D, Reinhard T, Spelsberg H, Sundmacher R (2004) Hinterkammerlinsenimplantation nach perforierender Keratoplastik. Mitursache für das späte Transplantatversagen? *Der Ophthalmologe*- online publiziert.

Boisjoly HM, Roy R, Bernard PM (1990) Association between corneal allograft reactions and HLA compatibility. *Ophthalmology* 97: 1689-1698

Budowle B, Sprecher CJ (2001) Concordance study on population database samples using the PowerPlex 16 kit and AmpFISTR COfiler kit. *J Forensic Sci* 46: 637-641

Butrus SI, Leung DYM, Gellis S et al (1984) Vernal conjunctivitis in the hyperimmunoglobulinemia E syndrome. *Ophthalmology* 91: 1213-1216

Cameron JA, Al-Rajhi AA, Badr JA (1989) Corneal ectasias in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 96:1915

Chaloin-Dufau C, Sun TT, Dhouailly D (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Diff Dev* 32:97-100

Chandler JW, Cummings M, Gillette TE (1985) Presence of Langerhans-cells in the central corneas of normal infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 113-116

Cheng JJY, Tseng SCG (1990). Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1301-1314

Cheng JJY, Tseng SCG (1991). Abnormal corneal wound healing in partial thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:96-105

Collaborative Corneal Transplantation Studies (1992) The collaborative corneal transplantation studies (CCTS) Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. *Arch Ophthalmol* 110: 1392-1403

Coles RS, Laval J (1957) Retinal detachments occurring in cataract associated with neuro-dermatitis. *Arch. Ophthalmol.* 48: 30-39

Cordes FC, Cordero-Moreno R (1946) Atopic cataracts. *American J. Ophthalmol.* 29: 402-407

Copeland RA, Char DH (1990) Limbal autograft reconstruction after conjunctival squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol* 110(4): 412- 417

Coster DJ, Aggarwal RK, Williams KA (1995) Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cell autografts. *Br J Ophthalmol* 79: 977-982

Coupland SE, Klebe S, Karow AC, Krause L, Bartlett RR, Hoffmann F (1994) Leflunomide (HWA-486) in the allogenic rat penetrating keratoplasty model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:1878

Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM (1989). Existenz of low cycling limbal epithelial basal cells, that can be preferentially stimulated to proliferate: implication on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201-209

Creemers PC, Kahn D, Hill JC (1999) HLA-A and HLA-B alleles in cornea donors as risk factors for graft rejection. *Transplant Immunol* 7: 15-18

Daya SM, Bell RW, Habib NE, et al (2000) Clinical and pathologic findings in human keratolimbale allograft rejection. *Cornea* 19, 443-450

Davanger M, Evensen A (1971) Role of the pericorneal peripapillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229: 560-561

Deierhoi M, Sollinger H, Diethelm A, et al (1993) One-year follow up results of a phase 1 trial of mycophenolat mofetil (RS-61443) in cadaveric renal transplantation. *Transplant Proc* 25: 693

Donnelly JJ, Li WY, Rockey JH, Prendergast RA (1985) Induction of class II (Ia) alloantigen expression on corneal endothelium in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 575-580

Dua HS, Gomes JA, Singh A (1994). Corneal epithelial wound healing. *Br Journal of Ophthalmol* 78: 401-408

Dua HS, Gomes JA, Singh A (1998). The conjunktiva in corneal epithelial wound healing. *Br Journal of Ophthalmol* 82: 1407-1411

Dua HS, Azuara-Blanco A (1999) Allolimbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 83: 414-419

Dua HS, Azuara-Blanco A (2000). Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 44: 415-425

Duke-Elder S, Leigh A (1965) Diseases of the outereye. Corneal grafts. In: Duke-Elder (ed) *System of ophthalmology*, vol 8. Kimpton, London, pp: 648-661

Ehlers N, Anderson J (1987) Treatment of central corneal ulcers by a choud transplantation of organ culture preserved donor tissue. *Acta Ophthalmol.* 516-520

Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Tseng SCG (2001) Limbal steem cell deficiency arrising from systemic chemotherapy. *Br J Ophthalmol* 85:373-374

European Mycophenolat mofetil Cooperativ Study Group (1995) Placebo control study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection. *Lancet* 345: 1321-1325

Ferguson TA, Waldrep JC, Kaplan HJ (1987) The immune response and the eye. II. The nature of T suppressor cell induction in anterior chamber-associated immune deviation. *J Immunol* 139: 352-357

Ferris FL, Kassoff A, Bresnick GH & Bailey I (1982) New visual acuity charts for clinical research. *Am J Ophthalmol* 94:91-96

Franceschetti A (1939) L'évolution de la kératoplastie. *Schw. Med. Wochenschr.* 69: 1015-1020

Franceschetti A (1940) Das Schicksal der Hornhauttransplantate. *Klein. Mbl. Augenheilkunde* 104: 333-335

Franceschetti A (1955) The different techniques of corneal grafting and their indications. *Am J Ophthalmol* 39: 61-66

Friedlaender MH (1993) *Allergy and Immunology of the eye*. Raven press, New York, second edition, 1993

Fujikawa LS, Calvin RB, Bhan AK, Fuller TC, Foster CS (1982) Expression of HLA-A/B/C and DR locus antigens on epithelial stromal and endothelial cells of the human cornea. *Cornea* 1: 213-216

Fujishima H, Shimazaki J, Tsubota K (1996) Temporary corneal stem cell dysfunction after radiation therapy. *Br J Ophthalmol* 80: 911-914

Gatinel D, Hoang-Xuan T (2000). Le deficit en cellules souches limbiques. *Journal Francais Ophtalmol* 23, 7, 718-728

Gibbs DC, Batechelor R, Werb A (1974) The influence of tissue-type compatibility on the fate of full-thickness corneal grafts. *Trans. Ophthalmol. Soc.* 94: 101-126

Giles RC, Capra JD (1985) Structure, function and genetics of human class II molecules. *Adv Immunol* 37: 1-42

Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV (1982) Langerhans cells on the ocular surface. *Ophthalmology* 89:700-711

Gigli I, Baer RL (1979) Atopic dermatitis. In: *Dermatology in general medicine*. Editor T.B. Fitzpatrick. McGraw-Hill Book Company, New York, DÜsseldorf, London, Tokyo, pp. 520-528

Girard LJ, Esnaolo N, Rao R (1993) Allograft rejection after penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmic Surg* 24:40–43

Goldberg DB, Schanzlin DJ, Brown SI (1981) Incidence of increased intraocular pressure after keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol.* 92: 372-377

Golberg MF, Bron AJ (1982). Limbal palissades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 80:155-171

Guo M, Grinnel F (1989) Basement membran and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol* 1989: 93: 372-378

Greiner JV, Covington HI, Allansmith MR (1979). The human limbus. A scanning electron microscopy study. *Arch Ophtalmol* 97: 1159-1165

Hall PA, Watt FM (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106: 619-633

Hanna C, Irwin ES (1962). Fate of cells in the corneal graft. *Arch Ophtalmol* 68: 810-817

Harms H (1954) Augenoperationen unter dem binokularen Mikroskop. *Ber. Dtsch. Ophthalmol Ges* 58: 119

Harms H (1957) Erfahrungen mit der fortlaufenden Naht der Keratoplastik. Marhold, Halle (Saale)

Hawkins RD, Benelli U, Damms T, et al. (1996) Effect of cyclosporine A on corneal vascularization induced by chemical cautery. Invest Ophthalmol Vis Sci 37 (suppl):1015

Henderson TRM, Mc Call SH, Taylor GR, Noble BA (1997) Do transplanted corneal limbal stem cells survive in vivo long term? Possible techniques to detect donor cell survival by polymerase chain reaction with the amelogenin gene and y-specific probes. Eye 11: 779-785

Henderson TRM, Coster DJ, Williams KA (2001) The long term outcome of limbal allografts: the search of surviving cells. Br J Ophthalmol 85: 604-609

Herman WK, Doughman DJ, Lindstrom RL (1983) Conjunctival autograft transplantation for unilateral ocular surface diseases. Ophthalmology 90:1121-1126

Hill JC (1989) The use of cyclosporine in high risk keratoplasty. Am J Ophthalmol 107: 506-510

Hill JC (1992) The use of systemic Cyclosporine to prevent graft rejection in highly vascularized corneas. Ophthalmology (1992), Supplement, p. 124

Hill JC (1994) Systemic cyclosporine A in high risk keratoplasty-short versus long-term therapy. Ophthalmology 101: 128-133

Hill JC, Creemers PC (1997) An adverse matching effect for the HLA-B locus in corneal transplantation. Transplant Int 10: 145-149

Hille K, Makuch D, Wilske J, Ruprecht KW (2002) Untersuchung zur Effektivität der Limbustransplantation. Ophthalmologe 99: 575-579

Hippel A. von (1877) Über die operative Behandlung totaler stationärer Hornhaut-Trübungen. Graefe's Arch Ophthalmol 23: 80-160



Hippel A. von (1878) Über Transplantation der Cornea. Graefe's Arch Ophthalmol 24:237-256

Hippel A. von (1888) Eine neue Methode der Hornhauttransplantation. Graefe's Arch Ophthalmol 34:108-130

Hirst LW, Fogle JA, Kenyon KR, Stark WJ (1982). Corneal epithelial regeneration and adhesion following acid burns in the rhesus monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 23: 764-73

Hoffmann F (1976) Nahttechnik bei perforierender Keratoplastik. Klin Mbl Augenheilk 584-590

Hoffmann F, Pahlitzsch T (1989) Predisposing factors in corneal graft rejection. Cornea. 8: 215-219

Holland EJ, DeRuyter DN, Doughman DJ (1987) Langerhans cells in organ cultured corneas. Arch Ophthalmol 105: 542-545

Holland EJ (1996) Epithelial transplantation for management of severe ocular surface disease. Trans Am Ophthalmol Soc 19: 677-743

Holland EJ, Schwarz GS (1996) The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. Cornea 15(6): 549-556

Holland EJ, Schwarz GS (2000) Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty five years. Cornea 19: 688-698

Hopkins KA, Maguire MG, Fink NE, Bias WB (1992) Reproducibility of HLA-A, -B und -DR typing using peripheral blood samples: results of retyping in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Group (corrected). Hum Immunol 33: 122-128

Huang AJW, Watson BD, Hernandez E, Tseng SCG (1988) Induction of conjunktival transdifferentiation on vaskularized corneas by photothrombic occlusion of corneal vaskularization. *Ophthalmology* 95: 228

Huang AJW, Tseng SCG (1991) Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Ophthalmol Vis Sci* 32: 96-105

Hurlbut WB, Domonkos AN (1954) Cataract and retinal detachment associated with atopic dermatitis. *Arch. Ophthalmol.* 52: 852-857

Iwata M, Kiritoshi A, Roat M, Yagihashi A, Thoft RA (1992) Regulation of HLA class II antigen expression on cultured corneal epithelium by interferon gamma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2714-2721

Jager MJ (1992) Corneal Langerhans cells and ocular immunology. *Reg Immunol* 4: 186-195

Jenkins C, Thuft S, Liu C, Buckley R (1993) Limbal transplantation in the management of chronic contact lens associated epitheliopathy. *Eye* 7:629-633

Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481

Kenyon KR, Tseng SCG (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96(5): 709-732

Khairuddin R, Wachtlin J, Hpfenmüller W, Hoffmann F (2003) HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. *Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol* 241: 1020-1028

Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, Dowling JE (1968) Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membran. *Am J of Ophtalmol* 65: 339-348

Khodadoust AA, Silverstein AM (1969) Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. *Invest. Ophthalmol.* 8: 180-195

Khodadoust AA (1973) The allograft rejection reaction: the leading cause of late failure of clinical corneal grafts. In *Ciba Foundation Symposium: Corneal graft failure*. Elsevier Amsterdam, pp 151-167

Kinoshita S, Friend J, Thoft RA (1981) Sex chromatin of corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 434-441

Kinoshita S, Friend J, Thoft RA (1983) Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunktival to corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1008

Klareskog L, Forsum U, Malmnits T, et al (1979) Expression of Ia antigen-like molecules on cells in the comeal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 310-313

Klemens F (1962) Dermatose, Katarakt und Ablatio retinae. *Klin. Mbl. Augenheilk.* 140: 657-663

Kobayashi T (1995) Cell kinetic analysis by fluorescence in situ hybridisation (FISH) on human corneal transplanted epithelial cells. *J Iwate Med Assoc* 47: 283-289

Kruse FE, Chen JJY, Tsai RJF, Tseng SCG (1990) Conjunktival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1903-1913

Kruse HA, Bechrakis NE, Heimann H, Diamantstein T, Hoffmann F (1991) Specific immunosuppressive therapy by monoclonal antibodies on rejection of orthoptic corneal allogenic grafts in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1119

Kruse FE, Tseng SCG (1993) A tumor promotor resistant subpopulation of progenitors cells is larger in limbal epithelium than in corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2501-2507

Kruse FE (1994). Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 8:170-183

Kruse FE (1996) Die Stammzellen des Limbus und ihre Bedeutung für die Regeneration der Hornhautoberfläche. *Der Ophthalmologe* 93: 633-643

Kruse FE, Meller (2001) Die Amnionmembrantransplantation zur Rekonstruktion der Augenoberfläche. *Der Ophthalmologe* 98: 801-810

Kruse FE, Reinhard T (2001) Die Limbustransplantation zur Rekonstruktion der Augenoberfläche. *Der Ophthalmologe* 98: 818-831

Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR (1990) Expression of the 55kD/64D corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:448-456

Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR (1992) The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 150: 243-255

Land W (1987) *Optimal use of Sandimmun in organ transplantation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 7-24

Landesz M, Siertsema JV, van Rij G. Comparative study of three semiautomated specular microscopes. *J.Cataract Refract.Surg.* 1995;21:409-416.

Lauweryns B, von den Oord JJ, Misotten L (1993) The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1991-1999

Li DQ, Tseng SCG (1995) Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interaction of human ocular surface. *J Cell Phys* 163: 61-79

Liu Y, Hamrah P, Zhang Q et al (2002) Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC Class II-negative grafts. *J Exp Med* 195: 259-268

Ludes B, Clisson I (2000) Short tandem repeat loci analysis in forensic caseworks. *Anthrop Anz* 58: 23-27

Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, et al (1994) Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 101: 1536-1547

Mantel N (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chernother Rep* 50:163-170

Manthey KF (1998) Immunsuppressive Therapie bei intraokularen Entzündungen. Teil II: Grundlagen, Indikationen, Kontraindikationen, Nebenwirkungen. *Ophthalmologie* 95: 846-858

Matic M, Petrov IN, Chen S, Wang C, Dimitrijevic SD, Wolosin JM (1997) Stam cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. *Differentiation* 61:251-260

Mayer DJ, Daar AS, Casey TA, Fabre JW (1983) Lokalisation of HLA-A, B, C and HLA-DR antigens in the human cornea: practical significans for grafting technics and HLA typing. *Transplant Proc* 15: 126-129

Meller D, Kruse F (2001) Ex-vivo Expansion kornealer Stamzellen. *Ophthalmologie* 98: 811-817

Merlyn MR, Rowden G, Hackett J, et al (1981) Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21:759-765

Mills R, Coster D, Williams K (2002) Effect of Immunosuppression on outcome measures in a model of rat limbal transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43. 647-655

Moldovan SM, Borderie V, Baudrimont M, Laroche L (1999) Traitement du syndrome d'insuffisance en cellules souches limbiques unilatéral par autogreffe de limbe. *J Fr Ophtalmol* 22,3 : 302-309

Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA et al (2001) Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage : performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci* 46: 647-660

Munkhbat B, Hagihara M, Shimazaki J, Kanai N, Morita N, Gansuvd B, Kato S, Tsubota K, Tsuji K (1999) The impact of HLA-A matching in corneal transplantation. *Tokai J Exp Clin Med* 24: 63-71

Muraine M, Salessy P, Watt L, Retout A, Brasseur G (2000). *Journal Francais Ophtalmol* 23, 2, 141-150

Newsome DA, Takasugi M, Kenyon K et al (1974) Human corneal cells in vitro : morphology and histocompatibility antigens of pure cell population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 23-32

Nieder Korn JY (1990) Immune privilege and immune regulation in the eye. *Adv. Immunol.* 48: 191-227

Nieder Korn JY, Mellon J (1996) Anterior chamber-associated immune deviation promotes corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2700-2707

Olsen T (1979) Non-contact specular microscopy of human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol* 57: 986-998

Paliaga GP (1993). *Die Bestimmung der Sehschärfe*. München, Quintessenz-Verlag

Peeler JS, Niederkorn JY (1986) Antigen presentation by Langerhans-cells in vivo: donor-derived Ia<sup>+</sup> Langerhans cells are required for induction of delayed type hypersensitivity but not for cytotoxic T lymphocyte responses to alloantigens. *J Immunol* 136: 4362-4371

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O et al (2001) p 63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3156-3161

Pels E, van der Gaag R (1984) HLA-A,B,C and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ cultured preserved corneas. *Cornea* 3: 231-239

Pepose JS, Gardner KM, Nestor MS, Foos RY, Pettit TH (1985) Detection of HLA class I and II antigens in rejected human corneal allografts. *Ophthalmology* 92: 1480-1484

Pleyer U, Weidle EG, Lisch W, Streuhl KP, Möhrle C, Richter U, Zierhut M, Selbmann HK (1990) Klinischer Verlaufsformen immunologischer Transplantatreaktionen nach perforierender Keratoplastik. *Fortschr Ophthalmol* 87: 114-19

Pleyer U, Elkins B, Rückert D et al. (1994) Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. *Curr Eye Res* 13: 177-181

Pleyer U (1997) Immunreaktion nach perforierender Keratoplastik. *Ophthalmologie* 94: 933-950

Puangricherern V, Tseng SCG (1995). Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 102: 1476-1485

Rahi A, Davies P, Ruben M, et al (1977) Keratokonus and coexisting atopic disease. *Brit. J. Ophthalmol.* 61: 761-764

Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P (1999). Limbal autografting from related live donors for corneal surface reconstruction. *Ophthalmology* 106: 822-828

Rehany U (1992) Suppression of allograft rejection in heavily vascularized human corneas. Second International Symposium on Ocular Inflammation. Jerusalem, 30 August- 3 September.

Reinhard T, Sundmacher R, Heering P (1996) Systemic cyclosporin A in high risk keratoplasties. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 115-121

Reinhard T, Sundmacher R (1997) Systemische Cyclosporin A Prophylaxe nach Keratoplastiken mit erhöhtem Risiko für Immunreaktionen als einzigem erhöhten Risikofaktor. Ophthalmologie 94: 496-500

Reinhard T, Hutmacher M, Sundmacher R, Godehardt E (1997) Akute und chronische Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik mit normalem Immunrisiko. Klin Mbl Augenheilk 210:139-143

Reinhard T, Kallmann C, Cepin A, Godehardt E, Sundmacher R (1997) The influence of glaucoma history on graft survival after penetrating keratoplasty. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 235:553-557

Reinhard T, Möller M, Sundmacher R (1999) Penetrating keratoplasty in patients with atopic dermatitis with and without systemic cyclosporin A. Cornea 18 (6): 645-651

Reinhard T, Ruzicka T, Sundmacher R (1999) Pathogenese, Klinik und Therapie der Augenbeteiligung bei Atopie. Ophthalmologie 96:473-488

Reinhard T, Sundmacher R, Spelsberg H, Althaus C (1999) Homologous penetrating central limbo-keratoplasty (HPCLK) in bilateral limbal stem cell deficiency. Acta Ophthalmol Scandinavica 77: 663-667

Reinhard T, Reis A, Malinowski M, Godehardt E, Sundmacher R (2000) Systemisches Mycophenolat Mofetil (MMF) und Cyclosporin A (CSA) nach perforierender Hochrisiko-Keratoplastik – 3-Jahres-Ergebnisse einer randomisierten, prospektiven Studie. Ophthalmologie Suppl 1, 2000, 97:26



Reinhard T, Böhringer D, Sundmacher R (2001) Accelerated chronic endothelial cell loss after penetrating keratoplasty in glaucoma eyes. *J Glaucoma* 10(6):445-451

Reinhard T, Reis A, Böhringer D, Malinowski M, Voiculescu A, Heering P, Godehart E, Sundmacher R (2001) Systemic mycophenolate mofetil with systemic cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: 3 years' results of a randomized prospective clinical trial. *Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 367-372

Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, Kontopoulos T, Enczmann J, Wernet P, Berschick P, Sundmacher R, Böhringer D (2004) Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 111 (4): 775-782

Reinhard T, Böhringer D, Enczmann J, Kögler G, Wernet P, Böhringer S, Sundmacher R (2004) HLA class I/II matching and chronic endothelial cell loss in penetrating normal risk keratoplastik. *Acta ophthalmol scandinavica* 82: 13-18

Reis A, Reinhard T, Voiculescu A et al (1999) Mucophenolate mofetil versus Cyclosporin A in high risk keratoplasty patients : a prospectively randomised clinical trial. *Br J of Ophthalmol* 83: 1268-1271

Reis A, Reinhard T, Voiculescu A et al (1999) Cellcept- Eine neue therapeutische Option nach perfirierender Hochrisiko- Keratoplastik. *Spektrum der Augenheilkunde* 13/5: 185-189

Reis A, Megahed H, Reinhard T et al (2000) Coadministration of the new macrolid immunsuppressant RAD and mucophenolate mofetil in experimental corneal transplantation. *Transplantation* 70: 1397-1401

Reis A, Megahed H, Reinhard T et al (2002) Synergism of RAD and cyclosporin A in prevention of acute rat corneal allograft rejection. *Cornea* 86: 81-84

Roelen DL, van Beelen E, Van Bree SP, van Rood JJ, Volker-Dieben HJ, Claas FH (1995) The presence of activated donor HLA class I-reactive T lymphocytes in associated with rejection of corneal grafts. *Transplantation* 59: 1039-1042

Ruusuvaara P (1979) Histocompatibility and corneal graft endothelium. *Acta Ophthalmol.* 57:968-981

Schermer A, Galvin S, Sun TT (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103: 49-62

Schönherr U, Martus P, Händel A, Naumann GOH (1996) Transplantatreaktion nach Keratoplastik wegen Keratokonus. *Ophthalmologie* 93:227–231

Schwarz GS, Holland EJ (1998). Iatrogenic limbal stem cell deficiency. *Cornea* 17: 31-37

Sharif KW, Casey TA (1991) Penetrating keratoplasty for keratoconus: complications and long-term success. *Br J Ophthalmol* 75:142–146

Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K (1996) Limbal autograft transplantation for recurrent and advanced pterygia. *Ophthalmic Surg Lasers* 27: 917-923

Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N et al (1999) Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. *Invest Ophthalmol Vi Sci* 40: 1664-1668

Smolin G (1983) *The cornea*. Little, Brown and Company, Boston, Toronto, S. 234-243

Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H et al (1991) Integrin  $\alpha 6/\beta 4$  complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion *J Cell Biol* 113: 907-917

- Sridhar MS, Vemuganti GK, Bansal AK, Rao GN (2001) Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. *Cornea* 20: 145-148
- Stenevi U, Hansson C, Claesson M, Corneliussen E, Ek S (2002) Survival of transplanted human corneal cells. Case report. *Acta Ophthalmol Scand* 80: 105-108
- Stewart RH, Kimbrough RL (1979) Intraocular pressure response to topically administered Fluorometholone. *Arch. Ophthalmol.* 97: 2139-2140
- Streilein W (1995) Unraveling immune privilege. *Science* 270(5239): 1158-1159
- Streilein JW (1996) Periphral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transplant-Proc* 28 (4): 2066-2070
- Streilein JW, Yamada J, Dana MR, Ksander BR (1999) Anterior chamber-associated immune deviation, ocular immune privilege, and orthotopic corneal allografts. *Transplant Proc* 31:1472– 1475
- Streuli CH, Bailey N, Bissel MJ, (1991) Control of mamary epithelial differentiaton: basement membran induces tissue-specific gen expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 115: 1383-1385
- Sundmacher R (1977) Immunreaktionen nach Keratoplastik. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 171:705-722
- Sundmacher R, Müller O (1983) Endothelzellverluste nach Keratoplastik. Spiegelmikroskopische Verlaufsbeobachtungen bei Immunreaktionen gegen Transplantatendothel. *Klin Monatsbl Augenheilk* 182:86-90
- Sundmacher R, Reinhard T, Heering P (1992) Six years experience with with systemic cyclosporin A prophylaxis in high risk penetrating keratoplasty patients. *German J Ophthalmol* 1:432-436

Sundmacher R, Reinhard T (1996) Central corneolimbaltransplantation under systemic Cyclosporin A cover for severe limbal stem cell deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 122-125

Sundmacher R, Reinhard T, Althaus C (1997) Drei Jahre Erfahrung mit der homologen zentralen korneolimbale Transplantation bei Limbusstammzellschäden. *Der Ophthalmologe* 94: 897-901

Sundmacher R, Reinhard T (1998) Homologe lamelläre Zentrale Limbo-Keratoplastik bei schwere Limbusstammzellinsuffizienz. *Klin Monatsbl Augenheilkunde* 213: 254-255

Sundmacher R, Reinhard T (2001). Bedarfsdeckung mit qualitäts-gesicherten Hornhauttransplantaten. Die Rolle der Hornhautbanken und der Kostenträger in Deutschland. *Ophthalmologe* 98:277-284.

Swift G, Aggarwal R, Davis G, Coster D, Williams K (1996) Survival of rabbit limbal stem cell allograft. *Transplantation* 62: 568-574

Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ (1996) Limbal transplantation. *Ophthalmology* 103: 29-36

Terranova VP, Lyall RM (1986) Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 57: 311-317

The Tricontinental Mycophenolate mofetil Renal Transplantation Study Group (1996) A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 61: 1029-1037

Thoft RA (1977) Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 95: 1425-1427

Thoft RA (1984) Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97: 1-6

Townsend WM (1991). The limbal palissades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 89: 721-751.

Treseler PA, Fulks GN, Sanfilippo F (1984) The expression of HLA antigens by cells in the human cornea. *Am J Ophthalmol* 98: 763-767

Tsai RJ, Sun TT, Tseng SCG (1990) Comparison of limbal and conjunktival autograft transplantation in corneal surface reconstruction rabbits. *Ophthalmology* 97: 446-455

Tsai RJ, Tseng SCG (1994) Human allograft transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 15: 389-400

Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR (1984). Goblet cell density and vaskularization during conjunctival transdifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:1168-1176

Tseng SCG, Farazdaghi M, Ridder AA (1987) Conjunktival trnsdifferentiation induced by systemic Vitamin A deficiency in vaskularized rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1497

Tseng SCG (1988) Application of corneal impression cytology to study conjunktival transdifferentiation defect. Orsoni J (ed) *Ophthalmic cytology*. Centro grafico editoriale universita degli studi di Parma pp65-75

Tseng SCG (1989) Concept and application of limbal steem cells. *Eye* 3: 141-157

Tseng SCG, Chen JJY, Huang AYW, Kruse FE, Maskin SL, Tsai RJF (1990). Classification of conjunctival surgeries for corneal diseases based on stem cell concept. *Ophthalmol Clin North Am* 3:595-610

Tseng SCG, Zhang SH (1995) Limbal epithelium is more resistant to 5-fluouracil toxicity than corneal epithelium. *Cornea* 14:391-401

Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J (1995) Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 102: 1486-1495

Tsubota K, Satake Y, Ohyama M et al (1996) Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular pemphigoid and Stephens Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 122: 38-52

Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J (1999) Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem cell transplantation. *New Engl J Med* 340: 1697-1703

Tuberville AW, Foster CS, Wood TO (1983) The Effect of Donor Cornea Epithelium Removal on the Incidence of Allograft Rejection Reactions. *Ophthalmol.* 90: 1351-1356

Vabres B, Duffas M, Stork L, P echereau A (1999) Facteurs non immunologiques d' echec des keratoplasties perforantes. *J Fr Ophthalmol* 22, 1 : 33-38

Vail A, Gore SM, Bradley BA, et al (1993) Corneal transplant follow-up study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 1366

Vail A, Gorre SM, Bradley BA et al (1994) Corneal graft survival and visual outcome, a multicenter study. *Ophthalmology* 1:120-127

Vail A, Gorre SM, Bradley BA et al (1996) Clinical and surgical factors influencing corneal graft survival, visual acuity and astigmatism. *Ophthalmology* 103: 41-49

Vail A, Gorre SM, Bradley BA et al (1997) Conclusions of the corneal transplant follow-up study. *Br J Ophthalmol* 81: 631-636

Vetter G (1952) Eine weitere Beobachtung von doppelseitiger Amotio bei Cataracta syndermatotica bilateralis. *Klin. Mbl. Augenheilk.* 120: 264-265

Völker-Dieben HJM, Kok-Van Alphen CC, Lansbergen Q, Persijn GG (1982) Different influences on corneal graft survival in 539 transplants. *Acta. Ophthalmol.* 60: 190-202

Völker-Dieben HJM, D'Amaro J, Kruit PJ et al (1989) Interactions between prognostic factors for corneal allograft survival. *Transplantation Proceedings* 21: 3135-3138

Wernet P, Kögler G, Enczmann J et al (1998) Rapid method for successful HLA class I and II typing from cadaveric blood for direct matching in cornea transplantation. *GraefesArch Clin Exp Ophthalmol* 236: 507-512

Whitsett CF, Stulting RD (1984) The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 571-574

Wilbanks GA, Streilein JW (1991) Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). *J Immunol* 146: 2610-2617

Williams KA, Lewis RF, Coster DJ (1995) How successful is corneal transplantation? A report from the Australian corneal graft register. *Eye* 9: 219-227

Williams KA, Brereton HM, Aggarwal R, et al (1995) Use of DNA polymorphisms and the polymerase chain reaction to examine the survival of a human limbal stem cell allograft. *Am J Ophthalmol* 120: 342-350

Williamson JSP, DiMarco S, Streilein JW (1987) Immunobiology of Langerhans cells on the ocular surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28:1527-1532

Young E, Stark WJ, Prendergast RA (1985) Immunology of corneal allograft rejection: HLA-DR antigens on human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 571-574

Zieske JD (1994). Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye* 8: 163-169

Zieske JD, Bukusoglu G, Yanckaukas MA (1992). Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 143-152

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Familienname :	Kontopoulos
Vorname :	Theodoros
Geburtsort :	Cholargos Athen
Geburtsdatum / Alter :	26.08.1978
Vater :	Andreas Kontopoulos (Metalingenieur)
Mutter :	Konstantina Kontopoulos (griechische, französische Philologie)
Familienstand :	ledig
Staatsangehörigkeit:	griechisch

### Berufliche Laufbahn

Seit Februar 2005	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Augenklinik des Dietrich-Bonhoeffer-Klinikums in Neubrandenburg
-------------------	--

### Akademische Laufbahn

1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
November 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1999	Ärztliche Vorprüfung

### **Praktisches Jahr:**

Okt 2002 - Jan 2003	<b><u>Augenklinik der Universität Düsseldorf</u></b> (Prof. Sundmacher)
Feb 2003 - Mai 2003	<b><u>Universitätsklinik, europäisches Krankenhaus Georges Pompidou, Paris</u></b> Abteilung der Thoraxchirurgie (Prof Riquet)
Jun 2003 – Sept. 2003	<b><u>Universitätsklinik, europäisches Krankenhaus Georges Pompidou, Paris</u></b> Abteilung der Onkologie (Prof Andrieu)



## **Weitere Qualifikationen und Prüfungen**

### **Promotion:**

Seit März 2000

Doktorarbeit in der Augenklinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf mit dem Thema: „Langfristige Prognose der korneolimbale Transplantation unter besonderer Berücksichtigung des HLA-Matching „ Unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard, Chefarzt der Augenklinik der Universität Freiburg.

### **Publikationen**

„Langzeitergebnisse der homologen perforierenden Limbokeratoplastik bei totaler Limbusstammzellinsuffizienz nach Verätzungen / Verbrennungen“, Reinhard T, Kontopoulos T, Wernet P, Enczmann J, Sundmacher R. Zeitschrift: Der Ophthalmologe, Juli 2004

„Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency“, Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, Kontopoulos T, Enczmann J, Wernet P, Berschick P, Sundmacher R, Böhringer D. Zeitschrift: Ophthalmology 2004, 111(4):775-82

### **Sprachkenntnisse :**

Griechisch	Muttersprache
Deutsch	Sehr gute Kenntnisse Kleines Deutsches Sprachdiplom, Goethe Institut
Französisch	Sehr gute Kenntnisse D.A.L.F. Diplome Approfondis de la Langue Francaise D.E.L.F. Diplome Elementaire de la Langue Francaise
Englisch	Sehr gute Kenntnisse

### **Freizeit-Aktivitäten**

- Aikido, Segeln, Malen, klassische Gitarre