

Aus der Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. A. Jousen

**Nachweis von Endotoxin in Kulturmedien humaner Hornhaut-Transplantate**

**und**

**deren Einfluss auf den postoperativen Endothelzellverlust**

**nach perforierender Keratoplastik**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Yevgeniya Sokolovska

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Gez.: Prof. Dr. Bernd Nürnberg, Dekan

Referentin: Prof. Dr. Antonia Jousen

Koreferent: Prof. Dr. Johannes Peter Heinz

Korefrentin: Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

Tage der mündlichen Prüfung: 25.10.07, 30.10.07

meiner Mutter gewidmet



## **Inhalverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	1.1. Anatomie der gesunden Hornhaut	2
	1.2. Embryologie	5
	1.3. Keratoplastik	6
	1.3.1. Geschichte der Keratoplastik	6
	1.3.2. Indikationen	8
	1.3.3. Patienten	9
	1.3.4. Spender	11
	1.3.5. HLA-Typisierung	14
	1.3.6. Postoperative Therapie	14
	1.3.7. Komplikationen	15
	1.3.7.1. Immunreaktion	15
	1.3.7.2. Idiopathischer Endothelzellverlust	17
	1.3.7.3. Weitere Eintrübungsursachen	18
	1.4. Endotoxin	18
	1.4.1. Entdeckung des Endotoxin	18
	1.4.2. Biologische Auswirkungen	19
	1.5. Limulus Amebozyte Lysate-Test	21
	1.5.1. Vorgeschichte und biologisches Prinzip	21
	1.5.2. Limulus polyphemus	22
	1.6. Studiendesign und Fragestellung	23
<b>2.</b>	<b>Materialen und Methoden</b>	<b>24</b>
	2.1. Spenderhornhautentnahme, -kultivierung und -evaluation	24
	2.2. Endotoxin-Nachweis mit Limulus Amöbozytenlysat-Tests	25
	2.2.1. Vorbereitung der Reagenzien	25
	2.2.2. Test-Durchführung	26
	2.2.3. Erstellung einer Standard-Kurve	26

2.3. Perforierende Keratoplastik	28
2.4. Postoperative Behandlung	29
2.5. Postoperative Kontrollen	30
2.6. Behandlung der Immunreaktionen	30
2.7. Untersuchungsablauf	30
2.8. Evaluierung der Endothelzelldichte	30
2.9. Statistische Analyse	31
2.10. Materialien	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1. Mittlere Endotoxin-Konzentration der Negativ-Kontrollen	34
3.2. Verworfen Hornhäute	35
3.3. Transplantierte Hornhäute	36
<b>4. Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>60</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>61</b>

## 1. Einleitung

Die Hornhaut (Cornea) ist das wichtigste brechende Medium im menschlichen Sehapparat. Die Brechkraft der Hornhaut beträgt normalerweise etwa 43 Dioptrien (dpt), die Brechkraft der Linse ungefähr 19 dpt. Das normalsichtige Auge hat insgesamt eine Dioptrienzahl von etwa 65. Die sehr viel größere Brechkraft der Hornhaut kommt zustande, weil das Licht beim Übergang vom optisch „dünnen“ Medium, der Luft, in das optisch viel dichtere Medium Hornhaut, sehr stark gebrochen wird. Wegen des viel größeren Anteils der Hornhaut an der Gesamtbrechkraft des Auges sind die Durchsichtigkeit und die Regelmäßigkeit der Hornhautoberfläche von größter Bedeutung für das scharfe Sehen. Die beiden Parameter hängen von vielen physiologischen Voraussetzungen wie z.B. von der präzisen ultrastrukturellen Anordnung der Kollagenfasern des Hornhautstromas und einem streng definierten Wassergehalt des Stromas, der Produktion des Kammerwassers, der Tränenflüssigkeit und der Zusammensetzung des Tränenfilms ab. Das verdeutlicht, wie vulnerabel die Hornhauttransparenz gegenüber Störeinflüssen ist. Dementsprechend können Erkrankungen der Hornhaut (siehe Kapitel 1.3.2) von Sehinderung bis zur Erblindung führen. Falls die Sehverschlechterung ausschließlich durch eine Hornhauterkrankung bedingt ist, ist dies chirurgisch mit einer Hornhautverpflanzung (Keratoplastik) zu heilen. Die Keratoplastik war die erste erfolgreiche Transplantation eines Organes beim Menschen. Neben der Bluttransfusion ist sie die am längsten durchgeführte und heutzutage die häufigste Übertragung eines Gewebes (Power 1873, Zirm 1906, Maguire et al.1994, Pleyer 2003). In Deutschland werden pro Jahr etwa 5000, in USA etwa 45.000 Hornhäute transplantiert (Hudde 2003). Allerdings liegt der geschätzte jährliche Bedarf mit 6000-7000 Hornhäuten viel höher (Sundmacher 2001), was bedeutet, dass viele Patienten an einer vermeidbaren Blindheit leiden.

Die 5-Jahre-Überlebensrate liegt bei einer Normalrisiko-Keratoplastik bei etwa 90 % (Reinhard 2001a, Thompson 2003). Dieser hervorragenden Prognose und dem einmaligen Immunprivileg liegt das ACAID-Phänomen (anterior chamber associated immune deviation = Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort) zugrunde (Niederhorn JY 1981, Niederhorn 2003). Bei dieser abweichenden Reaktion fehlt die Entwicklung einer DTH-Reaktion (delayed type hypersensitivity = Reaktion von verzögertem Typ) bei

normaler Bildung von Präkursoren spezifischer zytotoxischer T-Zellen und die Bildung komplementfixierender Antikörper bei erhöhten Titern nicht komplementfixierender Antikörper. Außerdem exprimieren die an die Vorderkammer angrenzenden Zellen Apoptose-induzierende Strukturen wie den Fas-Liganden, so dass inflammatorische Zellen beim Kontakt in Apoptose übergehen (Grisanti 1998, Streilein JW 1997, Reinhard 2002b). Allerdings ist das Immunprivileg nicht unüberwindbar, bei ausreichend starken Entzündungsreizen kommt es zum Zusammenbruch des Systems.

Andererseits reduziert sich bei Risikopatienten die 5-Jahre-Überlebensrate auf weniger als 50 % und liegt damit unter den Erwartungen, die bei Transplantation solider Organen (Leber, Nieren) gestellt werden kann (Waldock 2000). Die häufigste Ursache für ein Hornhaut-Transplantatversagen ist ohne Zweifel eine Immunreaktion (Böhnke 1991, Khodadoust 1969, Paufigue 1948, Reinhard 1997a, 1997b, Sundmacher R 1977, Niederkorn 2001, Vail 1994). Akute und chronische Abstoßungen sind die Hauptfaktoren, die die Langzeit-Transplantatüberlebensrate negativ beeinflussen. Immunologische Mechanismen der Abstoßung werden seit Jahrzehnten erforscht und beschrieben, es gibt aber immer noch keine genauen Antworten auf die Frage, wie die Abstoßung ausgelöst wird. Um als immunkompetenter Empfänger ein Allotransplantat abzustößen, müssen für die Immunantwort zuständige Lymphozyten (T-Zellen) erst das Antigen auf direktem oder indirektem Weg erkennen (Sykes M 1996). Einer der potentesten Trigger des Immunsystems ist Endotoxin.

Es ist bewiesen, dass während und nach der Entnahme die Spenderhornhaut mit den Bakterien und deren Produkt Endotoxin konfrontiert wird (Sobottka Ventura 1997).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Endotoxins auf das Hornhauttransplantat und sein postoperatives Überleben zu untersuchen,

### **1.1. Anatomie der gesunden Hornhaut**

Die Hornhaut ist zirkulär durch den Limbus von der Sklera abgegrenzt. Die normale menschliche Hornhaut ist meist horizontal elliptisch (Durchmesser 11,7 mm x 10,6 mm) und ist sphärisch gewölbt. Der Radius dieser Wölbung beträgt etwa 7,7 mm. Im Zentrum

ist die Hornhaut dünner (etwa 0,5 mm) als am Rand (etwa 0,67 mm), wobei auch eine tageszeitliche Schwankung infolge der Hydratation berücksichtigt werden muss.

Die menschliche Hornhaut besteht aus fünf Schichten (von außen nach innen) (Abbildung 1):

- Epithel

Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel ist etwa 40-100 µm dick, wobei seine Dicke zum Limbus hin zunimmt. Das Hornhautepithel besteht aus drei verschiedenen Zelltypen, den Basal-, Flügel- und Schuppenzellen. Die oberflächlichen Zellen, die an den Tränenfilm angrenzen, sind mit vielen Mikrozotten bzw. Mikrovilli besetzt. Ihre Höhe beträgt etwa 0,5 µm, ihre Breite 0,3 µm und ihr Abstand ca. 0,5 µm. Diese Zellen stabilisieren vermutlich den präcornealen Tränenfilm und sind an der Aufnahme von Nährstoffen beteiligt. In den unteren Schichten des Epithels sind Langerhanszellen, eine Untergruppe der dendritischen Zellen, lokalisiert. Sie exprimieren MHC-Klasse II-Antigen und gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen.

- Bowman-Basalmembran (*Lamina limitans anterior*)

Die Basalmembran ist wenige µm dicke Schicht. Durch die Desmosomenkontakte an den Vorder- und Seitenwänden und den Hemidesmosomen-Bündeln als Verankerung der Basalzellen an der Basalmembran, ist das Epithel widerstandsfähig gegen mechanische Reize. Die Basalmembran ist im Stroma stärker verankert als im Epithel, obwohl es sich bei dieser Membran um eine Epithelstruktur handelt.

Die Bowman-Membran ist eine wenige Mikrometer dicke, zellfreie Schicht, aus ungeordneten Kollagenfibrillen. Im Gegensatz zum Epithel kann sie nicht regenerieren.

- Stroma

Das Stroma macht ca. 90 % der gesamten Hornhautdicke aus (400-500 µm) und besteht aus Keratozyten, Fibroblasten, Kollagenfibrillen und der dazwischen liegenden Grundsubstanz. Die Kollagenfibrillen sind lamellenartig parallel zur Oberfläche geschichtet. Durch diese Schichtung und durch den relativ dehydrierten Zustand des Stromas ist die Transparenz gewährleistet.

- Descement-Membran, oder Demours-Membran (*Lamina limitans posterior*)

Die Descemet-Membran ist 5-7  $\mu\text{m}$  dick, besteht aus einem Netzwerk von Kollagenfibrillen und ist mechanisch extrem belastbar.

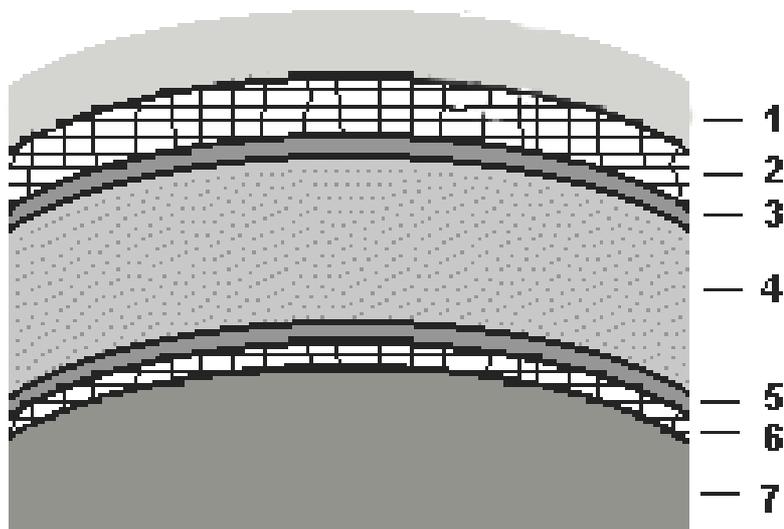
#### - Endothel

Die Endothelzellen sind flach, überwiegend hexagonal und kleiden die Hornhautinnenseite einschichtig aus. Diese Zellen dienen der Entquellung der Hornhaut. Durch einen aktiven Transport von Natrium-, Kalium- und Hydrogenkarbonat-Ionen tritt das Wasser aus dem Stroma in die Vorderkammer über. Die Zonulae occludentes als Verbindung der nebeneinander liegenden Endothelzellen verhindern einen Wasserübertritt in umgekehrter Richtung und damit eine Quellung des Stromas.

Die gesunde Hornhaut enthält keine Blut- oder Lymphgefäße. Die äußeren Schichten der Hornhaut werden durch die Tränenflüssigkeit, die inneren durch das Kammerwasser mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Epithelzellschicht wird vom Limbus kontinuierlich erneuert, so dass Epithelverletzungen innerhalb von Stunden verheilen können. Das Stroma kann sich durch Zellteilung der Fibroblasten innerhalb von Jahren nur langsam erneuern. Der Endothelzellschicht ist nur begrenzt regenerationsfähig.

Die Hornhaut ist von sensiblen Nervenästen des N. ophthalmicus, ein Ast des N. trigeminus (V. Hirnnerv) innerviert, die in der Cornea nicht myelinisiert sind. Die entsprechenden Nervenfasern verlaufen im vorderen Hornhautstroma.

Abbildung 1. Schichtaufbau der gesunden Hornhaut



1. Tränenfilm
2. Epithel
3. Bowmanmembran oder Lamina limitans anterior
4. Stroma oder Hornhautparenchym
5. Descemetische Membran oder Lamina limitans posterior
6. Endothel
7. Kammerwasser

## 1.2. Embryologie

Nur das Epithel entstammt dem embryonalen Ektoderm, die übrigen Hornhautschichten entwickeln sich aus dem Mesoderm. Der Hornhautdurchmesser eines Neugeborenen beträgt im Mittel 9,5 mm. Das Hornhautwachstum ist Ende des zweiten Lebensjahres beendet.

### **1.3. Keratoplastik**

Die Hornhautverpflanzung kann entweder lamellär oder perforierend geschehen. Die lamelläre Dissektion der Empfänger- und Spenderhornhaut, bei der einzelne Schichten isoliert verpflanzt werden, kann als tiefe anteriore oder posteriore lamelläre Keratoplastik, als lamelläre Segment-Keratoplastik oder Epikeratoplastik erfolgt werden. Bei der perforierenden Keratoplastik wird die Hornhaut in voller Dicke mittels Trepanation transplantiert. Es entsteht Kontakt des Transplantates zum Kammerwasser und die Prozedur ist wesentlich invasiver (Seitz 1999).

Nur die Ergebnisse nach perforierender Keratoplastik wurden in dieser Arbeit berücksichtigt.

In der Regel wird für die optische Keratoplastik ein zentrales mit einem Durchmesser von sieben bis acht Millimeter durchmessendes rundes Scheibchen exzidiert und durch ein klares Transplantat eines verstorbenen Spenders ersetzt. Die Spenderhornhaut wird mit einem 30 µm dünnen 10-0-Nylon-Faden wasserdicht eingenäht. Diese Naht wird aufgrund der langsamen Wundheilung bei bradytropem Stoffwechsel erst nach 12 bis 18 Monaten entfernt.

#### **1.3.1. Geschichte**

1792 wurde zum ersten Mal ein Korneaersatz durch in Silberring gefasstes Konvexglas von D. Pellier vorgenommen. Die erste Formulierung der Hornhautübertragung stammte 1813 von Karl Himly (Rohrbach JM). 1823 Meissner, 1824 Reisinger, 1837 Bigger führten Keratoplastiken bei Tieren durch. In New York wagte R. Kissam 1838 eine heterologe Keratoplastik am Menschen (Spender: Schwein). In Russland wurde 1838 einem Kind eine Kaninchenhornhaut verpflanzt (Sarenko 1856). Beide Versuche endeten mit dem Verlust des operierten Auges. Die erste technisch erfolgreiche perforierende Keratoplastik wurde 1878 von Sellerbeck beschrieben. Allerdings war es damals 20 Stunden nach der Operation zu einer Eintrübung gekommen (Sellerbeck 1878). Die erste erfolgreiche heterologe lamellierende Keratoplastik gelang 1888 Arthur von Hippel. Fuchs führte 1901 größere Reihen homologer lamellierender Keratoplastiken am Menschen durch. Erst im

Jahr 1905 gelang Eduard Zirm eine perforierende Keratoplastik bei einem Patienten nach beidseitiger Kalkverätzung. Das eingesetzte Transplantat blieb über ein Jahr lang optisch klar (Zirm 1906). Diese Operation, die mit frischem Gewebe von einem kurz zuvor enukleierten menschlichen Auge erfolgte, gilt als die erste erfolgreiche Keratoplastik. (Lund O 1985). Nach E. Zirm trugen vor allem A. Elschnig und V. Filatov, der erstmalig eine konservierte Leichenhornhaut transplantierte, entscheidend zur Verbreitung der Keratoplastik bei. Ganz wesentlich war auch der Beitrag von Heinrich Harms, der mit der Einführung des Operations-Mikroskopes und den fortlaufenden monofilen Kunststoffäden (Harms 1954, 1957).

Die ersten Versuche, eine getrübe Kornea durch eine klare zu ersetzen, scheiterten zu Beginn des 19. Jahrhunderts bis in das 20. Jahrhundert an technischen und chirurgischen Problemen. Das Gelingen einer Hornhautübertragung war ohne entsprechendes Operationsmikroskop, Instrumentarium und Nahtmaterial dem Zufall überlassen (Duke-Elder 1965).

In den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts lag der Schwerpunkt auf der Verbesserung der chirurgischen Technik. So wurde viel mit Transplantatgröße und -form sowie mit der Nahttechnik experimentiert. Einen großen Beitrag leisteten hier Paton, R. Castrovjevo, W. Löhlein, I. Barraquer, A. Franceschetti und viele andere (Albert 1996, Mannis 1981). Ein weiterer Meilenstein in der Keratoplastik-Geschichte ist die Entstehung von Hornhautbanken und Entwicklung von neuen Konservierungsmethoden. McCarey und Kaufmann entwickelten 1974 das MK-Medium zur kurzzeitigen Hornhautaufbewahrung, das eine sichere Transplantatkonservierung von über 48 Stunden erlaubte (McCarey 1974). Dabei sind die Hornhautbanken mit bakterieller Kontamination von Organkulturen in bis zu 40 % konfrontiert (Sobottka 1998).

Die heutige technische Entwicklung der Mikrochirurgie hat entscheidend zu guten operativen Ergebnissen beigetragen, so dass nun die biologische Akzeptanz des übertragenen Gewebes in den Vordergrund der postoperativen Komplikationen gestellt wird (Pleyer 1997), da die Abstoßung weiterhin die größte Bedrohung für das Transplantatüberleben und den langfristigen Therapieerfolg nach Keratoplastik darstellt (Bertelmann 2003). Die erste Beschreibung einer Transplantatabstoßung nach perforierender Keratoplastik erfolgte durch Paufigue. Er nahm eine allergische Genese der Reaktion an und prägte den Begriff der Transplantaterkrankung "La maladie du Greffon"

(Paufique 1949). Durch neue Erkenntnisse über die zentrale Rolle des Immunsystems bei der Transplantat-Abstoßung begann man die Versuche mit Immunsuppressiva durchzuführen (Maumenee 1951). Von 1960- 1970 führten Khodadoust und Silverstein eine Serie von Studien durch, die demonstrierten, dass alle 3 Schichten des Transplantates (Epithel, Stroma, Endothel) unabhängig von einander von einer Immunreaktion betroffen sein können und diese Reaktion durch immunisierte Lymphozyten hervorgerufen wird (Khodadoust 1969, 1976).

### **1.3.2. Indikationen**

Eine perforierende Keratoplastik kann zur optischen Rehabilitation bei folgenden Hornhauterkrankungen durchgeführt werden:

- Hornhautnarben nach Herpes-Keratitis oder anderen Hornhautinfektionen, nach scrophulöser Keratokonjunktivitis, nach Trauma/ Verätzungen
- Hornhautdystrophien (hier die häufigsten): Keratokonus, Fuchs Endotheldystrophie, Kerathopathia bullosa nach intraokularen Eingriffen oder nach protrahiertem Glaukomanfall, gittrige und bröcklige Epitheldystrophie, makuläre Stromadystrophie.

Verschiedene prognostische Faktoren haben eine so ausschlaggebende Bedeutung für das Schicksal des Transplantates, so dass man die Hornhauttransplantationen grundlegend in Normal- und Hochrisiko-Keratoplastiken einteilen muß (Reinhard 1998). Zu Normalrisikofällen gehören Erstkeratoplastiken in avaskulärer Wirtshornhaut mit limbusfernem Transplantat bei:

- Keratokonus,
- Fuchs Endotheldystrophie,
- posttraumatischen Hornhautnarben.

Faktoren, die mit einer Erhöhung des Risiko für eine Abstoßung des Transplantates nach Durchführung einer perforierenden Keratoplastik einhergehen sind umfassend untersucht u (Engelmann 2006) und sehr heterogen:

- tiefe Wirtshornhautvaskularisationen in mehr als 2 Quadranten,
- limbusständige Transplantatposition oder Transplantatdurchmesser über 8 mm,

- Re-Keratoplastiken nach vorausgegangenes Transplantatversagen,
- Oberflächenmilieustörungen (atopische Keratopathie, Limbusstammzellinsuffizienz Sicca-Syndrom oder andere Epitheliopathien)
- Steroid-Response-Glaukom,
- infektiöser Keratitis (Herpes simplex Virus, Akantamöben)
- Transplantation bei Säuglingen, Kleinkindern

(Sundmacher 1977, 1983, 1994, Reinhard 1992, 1997c, Reis 2001, Hill 2002, Mayer 2003, Engelmann 2006).

Zwar wird der Einsatz der Keratoplastik durch die Transplantatabstoßung limitiert, die Prognose ist aber bei Normalrisiko-Keratoplastik im Hinblick auf die Klarheit des Transplantates exzellent. Durch den fehlenden Kontakt zu immunkompetenten Blutzellen wird die transplantierte Hornhaut nicht als fremd und damit „abstoßungswürdig“ erkannt. (Reinhard 2002).

Zur Prophylaxe von Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik stehen derzeit zwei klinisch erprobte Möglichkeiten zur Verfügung: die Verwendung von HLA-gematchten Transplantaten (HLA A, B, DR) und der Einsatz von potenten lokalen und systemischen immunsuppressiven Medikamenten.

### **1.3.3. Patienten**

Wir haben 156 Patienten nach perforierender Keratoplastik, die zwischen August 1998 und Februar 1999 durchgeführt wurden, evaluiert, wobei 2 Patientinnen an beiden Augen transplantiert wurden. Somit wurden 158 Hornhäute in die Statistik eingeschlossen. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug 5 Jahre. Die Daten der Patienten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Patientendaten: Alter, Geschlecht, Risikogruppe, Diagnosen (Kp = Keratoplastik), Operationstechnik, Transplantatdurchmesser, Anaesthesie, postoperative Immunsuppression bei Hochrisikopatienten

Mittleres Alter (Jahre) zum Zeitpunkt der Operation (Spannweite)	56,52 ± 20,64 (3-95)
Geschlecht	
Frauen	73
Männer	85
Risikogruppe:	
Normalrisiko-Kp	105
Hochrisiko-Kp	53
Diagnosen Normalrisiko-Gruppe	105
Keratokonius	37
Fuchs´sche Endotheldystrophie	30
Bullöse Keratopathie nach Cataract-Operation	24
Hornhaut-Narben nicht-infektiöser Genese	2
Perforation	1
Scrophulosa	6
Bakterielles Ulkus	5
Diagnosen Hochrisiko-Gruppe	53 Augen von 51 Patienten
Re-Kp	7
Vaskularisationen in mehr als 2 Quadranten	3
Schwere Atopie, Sjögren-Syndrom, chron. Polyarthritits	10 Augen von 8 Patienten
Limbusstammzellinsuffizienz	2
Limbusständige Transplantate oder Limbus-Kp	13
Steroid-Response-Glaukom	1
HSV-, Akanthamöben-Keratitits	16
Kleinkind	1
Transplantatdurchmesser	
< 8,0	132
≥ 8,0	26
Anästhesie	
Retrobulbär	132
Intubationsnarkose	26
Operationstechnik:	
perforierende konventionelle Kp	130
perforierende Limbo-Kp	7
perforierendene Kp a chaud	20
perforierendene Kp a chaud mit Limbus	1
Postoperative systemische Therapie bei Hochrisiko-Kp	
Nur Cortison (Ultralan®)	119
Cyclosporin A (Sandimmun optoral®)	17
Mycofenolat mofetil (CellCept®)	9
Cyclosporin A + Mycofenolat mofetil	1
Aciclovir (Zovirax®)	4
Aciclovir + Mycofenolat mofetil	8

### 1.3.4. Spender

Hornhauttransplantate können bis 72 Stunden nach dem Herz-Kreislauf-Stillstand unabhängig vom Alter des Spenders entnommen und bei guter Qualität transplantiert werden. Hornhäute können also nicht nur bei Patienten mit bei Hirntod aufrechterhaltenem Kreislauf, sondern auch längere Zeit nach komplettem Atem- und Kreislaufstillstand entnommen werden. Nach den Richtlinien zum Führen einer Hornhautbank (Bundesärztekammer 2000), die auf dem am 01.12.1997 in Kraft getretenen Transplantationsgesetz beruhen und die Durchführungsbestimmungen der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Hornhautbanken zugrunde liegen, sollte jedes erkennbare Übertragungsrisiko vermieden werden.

Absolut auszuschließen als Hornhautspender sind Personen mit einer positiven Serologie für Hepatitis-B-Virus-Antigen (HbsAg), mit Hepatitis-C-Virus-Antikörpern (Anti-HCV ), mit Hepatitis-C-Virus-RNA und mit HIV-1/2-Antikörpern sowie Personen, deren Risiko für eine HBV-, HCV- oder HIV-Infektion im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht ist, wie zum Beispiel bei weiblichen und männlichen Prostituierten, bei parenteral Drogenabhängigen, bei 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, scheiden als Spender aus, da diese Patienten eine potenzielle Infektionsquelle für neurovirale Infektionen („slow virus disease“) und so genannte Prionenerkrankungen wie CJD, vCJD und Kuru-Kuru sein könnten (Kennedy 2001). Ebenso schließen zentralnervöse Erkrankungen unklarer Genese wie Multiple Sklerose, amyotrophe Lateralsklerose, M. Alzheimer und die durch Prionen ausgelöste Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung eine Hornhautspende aus. Klinisch manifeste Infektionen mit bestimmten Bakterien (Typhus abdominalis, Leptospirosen, Borreliosen, Brucellosen, Syphilis, Tuberkulose, Rickettsiosen und Tularämie), bestimmten Viren (Masern, Röteln, Varicella-Zoster, Meningitis, Enzephalitis und Rabies), Pilzen oder Parasiten (Malaria, Toxoplasmose, Trypanosomiasis und Leishmaniasis) gelten als weitere Ausschlusskriterien. Lebendimpfungen gegen Röteln, Masern, Mumps, Poliomyelitis oder Gelbfieber vier Wochen vor Hornhautexplantation oder eine bis zu zwölf Monate zurückliegende postexpositionelle Tollwutimpfung machen eine Hornhautspende unmöglich. Eine Sepsis

mit Methicillin oder Vancomycin resistentem *Staphylococcus aureus* oder mit Pilzen verbietet eine Hornhautspende. 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. Voroperationen am Auge sind kein grundsätzliches Ausschlusskriterium. Typischerweise bestehen nur etwa 50-60 Prozent der entnommenen Hornhäute die strengen Qualitätssicherungskriterien einer Hornhaut-Bank. Heute ist die sogenannte Organkultivierung bei ca. 34 °C die Methode der Wahl, bei der Spendergewebe maximal vier Wochen bis zur Transplantation aufbewahrt werden kann (Wilhelm 2002). Die Arbeitsgemeinschaft Deutscher Hornhautbanken empfiehlt und fördert dieses Verfahren im Gegensatz zur Kurzzeitkonservierung, welche in der USA üblich ist. Der Zeitfaktor ist wichtig, um primär nicht erkennbare mikrobiologische/virologische/mykotische Kontaminationen aufzudecken und weil mit der Zeit die dendritischen Langerhanszellen das Transplantat verlassen und damit seine immunologische Verträglichkeit besser wird. Außerdem kann die Vitalität des Spenderendothels verlässlicher abgeschätzt werden. Es wird möglich, Patient und Transplantat (insbesondere bei HLA-Typisierung) in einem großräumigen Versorgungsgebiet optimal zusammenzuführen und damit die Operation so zu planen, dass der Patient eine mindestens zweitägige Organisationsfrist erhält und nicht – wie früher – jederzeit zu Hause abrufbar sein oder gar im Krankenhaus auf ein geeignetes Transplantat warten muss.

Zwischen August 1998 und Februar 1999 wurden, wie oben beschrieben, 312 Spenderhornhäute derart kultiviert und evaluiert. Von diesen wurden 410 Proben mikrobiologisch sterile Organkulturmedien konsekutiv gesammelt (Abb.2). Davon waren 301 Proben aus Kulturmedium I und 109 aus Kulturmedium II. Von den 312 Hornhäuten wurden 125 verworfen, 158 in eigenem Hause transplantiert, 2 aufgenäht und weitere 27 über Bio Implant Services Foundation (BIS), Leiden, Niederland, an andere Kliniken versandt (Abb.3).

Die Spenderdaten sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

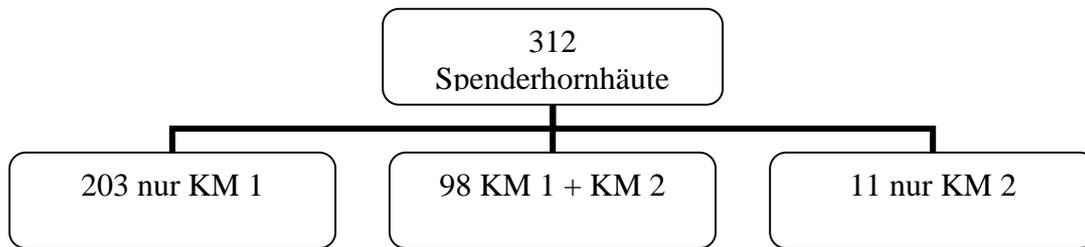


Abbildung 2. Organkulturmedien.

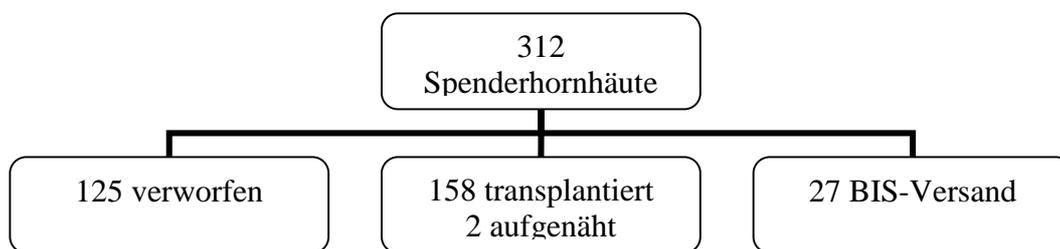


Abbildung 3. Transplantierte und verworfene Hornhäute

Tabelle 2. Spenderdaten: Geschlecht, Alter, Todesursache, Post-mortem-Zeit, Kulturdauer, präoperative Endothelzellzahl, Verwerfungsursache

	Transplantierte Hornhäute	Verworfene Hornhäute
Spender Geschlecht	158	125
Frauen	60	42
Männer	98	83
Spender Alter(Jahre)	59,7 ± 18,1 (18-92)	61,3 ± 17,5 (19-95)
Spender Todesursache		
Herz-Kreislauf-Versagen	75	70
Neoplasmen	22	21
Äusserliche Einflüsse	34	10
Respiratorische Insuffizienz	5	10
Infektion	21	12
unbekannt	1	2
Post-mortem-Zeit (Stunden)	19,5 ± 17,9 (1-66)	16,9 ± 17,3 (1-51)
Kulturdauer (Tage)	17,5 ± 4,1 (9-25)	12,3 ± 4,9 (7-23)
Verwerfungsursache		
Endothelzellschaden, Narben		116
Kontamination		2
HBV/ HCV-Ag positiv		7

### **1.3.5. HLA-Typisierung**

Die Verwendung eines „gematchten“, d.h. in den HLA Kriterien übereinstimmendes Transplantates kann eine weitere Verbesserung der Prognose bewirken (Böhringer 2004, Reinhard 2004).

Das HLA-System („human leucocyten antigen“) ist auf dem kurzen Arm des 6. Chromosoms kodiert und besteht aus der Klasse I (HLA-A, -B und -C) sowie aus der Klasse II (HLA-DO, -DP, -DQ, -DR, -DX, -DZ, wobei momentan nur HLA-DR berücksichtigt wird). HLA-Klasse I- Antigen wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, HLA-Klasse II befindet sich nur auf immunkompetenten antigenpräsentierten Zellen: B-Lymphozyten, Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten, in der Hornhaut z.B. auf epithelialen Langerhans-Zellen und nach entzündlichem Stimulus aber auch auf kornealen Endothelzellen (Donnelly 1985, Young 1985). Die früheren klinischen Ergebnisse zum HLA-Match bei perforierender Keratoplastik sind recht widersprüchlich (Wachtlin 2003), da die Typisierungsmethoden zumeist ungenau waren. In den letzten Jahren haben viele Studien einen deutlichen Vorteil und damit auch ein längeres klares Transplantatüberleben bei gematchten Transplantaten in Normal- und Hoch-Risikogruppen gezeigt (Bartels 2001, Reinhard 2003, Böhringer 2006). Der Grad der HLA-AB und HLA-DR Kompatibilität beeinflusst das Transplantatüberleben signifikant (Völker-Dieben 2000, Reinhard 2003, Khaireddin 2003, Beekhuis 2003).

### **1.3.5. Postoperative Therapie**

Während bei Normalrisiko-Keratoplastiken eine kurzzeitige systemische und lokale Immunsuppression mit Kortikosteroiden in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine zufriedenstellende Prophylaxe gegen Abstoßung darstellt, erfordert bei einer Hochrisiko-Keratoplastik eine länger dauernde und tiefgreifende Manipulation des Immunsystems (Sundmacher 1992).

In unserer Klinik erhalten alle Patienten (mit Ausnahme Patienten mit Steroid-Response-Glaukom oder bei internistischen Kontraindikationen) Fluorocortolon (Ultralan®) etwa 1 mg/kg Körpergewicht/Tag, über 3 Wochen ausschleichend, sowie lokal Prednisolonacetat

(Inflanefran forte®) 5x/Tag über 5 Monate ausschleichend. Bei (Hoch)-Risikofällen wurde in der Vergangenheit Cyclosporin A (Sandimmun optoral ®) 2xtgl. mit Blutspiegel-Zielwert 130-150 ng/ml mindestens 6 Monate gegeben. Wegen der breiten Nebenwirkungsspektrums (neuro-, nephro-, gastro-, hepatotoxisch, Bluthochdruck) hat sich Mycophenolat mofetil 2x1g/Tag mindestens für 6 Monate als Alternative bereits durchgesetzt (Reis 1999, Bertelmann 2003, Reinhard 2005). In besonders schweren Fällen werden die beiden Präparate kombiniert (Reinhard 2001a). Im Falle einer herpetischen Infektion bekommen die Patienten zusätzlich zur Immunsuppression oder auch als Einzelpräparat Aciclovir (Zovirax ®) 5x 200 mg/ Tag für 1 Jahr (Reis 2001, Mayer 2003).

### **1.3.7. Komplikationen**

#### **1.3.7.1. Immunreaktion**

Das zentrale Problem der Transplantation allogener Organe ist die Immunantwort von Lymphozyten des Empfängers gegen die Fremdantigene des Spenders (Krensky 1990). Die akute Abstoßung ist auf primäre Aktivierung der T-Zellen zurückzuführen. T-Zellen exprimieren entweder CD4 oder CD8 Glykoproteine auf ihrer Oberfläche. CD4-Expression (proliferative T-Zell-Antwort) geschieht auf Donor-HLA-Klasse II. CD8 (zytolytische T-Zell-Antwort) ist gegen HLA-Klasse I gerichtet. Die Erkennung von fremdem Antigen durch T-Zellen kann direkt, d.h. durch Erkennung intakter MHC-Klasse-II Moleküle auf den Donor-Zellen, oder indirekt erfolgen. Unter indirekter Erkennung versteht man, dass vom Transplantatgewebe stammende Proteine von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) des Empfängers prozessiert und als Peptide im Komplex mit eigenen MHC präsentiert werden (Gould 1999).

Im Unterschied zu soliden Organen bleiben viele korneale Transplantate trotz nicht vorhandener Gewebeübereinstimmung klar und es tritt auch bei vollständigem Mismatch nicht unbedingt eine Immunreaktion auf (Wachtlin 2003). Dieses immunologische Privileg erscheint biologisch sinnvoll, da sonst die Klarheit der optischen Medien durch jeden Entzündungsprozess gefährdet wäre und ist durch folgende Gründe zu erklären:

- Mangel an Blut- und Lymphgefäßen. Dadurch werden die Fremdantigene vermindert präsentiert und das Immunsystem nicht aktiviert. Zusätzlich werden die

Blutbestandteile durch eine Blut-Kammerwasser- und Blut-Retinaschranke selektiert. Viele Laborstudien konnten belegen, dass weitere Faktoren dazu beitragen: das übertragene Hornhautgewebe ist frei von antigenpräsentierenden Zellen, wodurch der direkte Immunreaktionsweg keine Rolle spielt.

- Hornhautepithel- und – endothelzellen exprimieren Fas-Liganden, der zu Apoptose bei inflammatorischen Zellen führt (Reinhard 2002).

- Außerdem können Alloantigene in der Vorderkammer eine Immundeviation der systemischen Immunantwort bewirken. Bei diesem „anterior chamber associated immun deviation“ (ACAID)- Phänomen sind Vorderkammer und Hornhaut insofern immunologisch privilegiert, indem z. B. Fremdanigene, die in die Vorderkammer eingebracht worden, über den Blutweg zur Milz gelangt und dort zu einer Supprimierung der zellulären Immunantwort bzw. zur Toleranz führt (Niederhorn 1981, 1999)

Abstoßungsreaktionen nach perforierender Keratoplastik werden zum einen nach der Dynamik in akut und chronisch, zum anderen nach der Lokalisation der Reaktion in epithelial, stromal und endothelial unterteilt (Reinhard 1997). Diese können isoliert oder kombiniert auftreten und zeigen ein typisches klinisches Bild.

Die epitheliale Immunreaktion zeigt sich als feine, erhabene, weiße Lymphozytenlinie, die sich zirkulär innerhalb von Tagen bis Wochen von der Peripherie des Transplantats nach zentral fortbewegt. Der Patient hat normalerweise keine Beschwerden und das Auge erscheint reizfrei. Obwohl diese Reaktion selbst keine Bedrohung für das Transplantat darstellt, ist sie häufig mit ernsteren Formen der Transplantatabstoßung assoziiert. Somit muss die epitheliale Abstoßungsreaktion als Zeichen erhöhter immunologischer Aktivität nach Keratoplastik gedeutet werden. Eine Kombination mit endothelialen Präzipitaten ist möglich.

Als akut werden endotheliale Immunreaktionen bezeichnet, bei denen Endothelpräzipitaten und ein konsekutives stromales Transplantatödem (typischerweise im Sinne einer Khodadoust- Linie) vorliegen. Als chronisch werden die Immunreaktionen eingestuft, bei denen frische und pigmentierte Transplantatendothelpräzipitate (noch) ohne stromales Transplantatödem, wohl aber mit umschriebenem, spiegelmikroskopisch sichtbarem Endothelzellödem vorliegen. Akute stromale Immunreaktionen weisen infiltrative Transplantateinschmelzungen auf, chronisch stromale Immunreaktionen nur

stromale/subepitheliale nummuläre Transplantattrübungen. Eine akute stromale Abstoßung ist sehr selten.

Besonders eine endotheliale Abstoßung ist ein limitierender Faktor im Langzeitverlauf nach perforierender Keratoplastik. (Vali 1996).

### **1.3.7.2. Idiopathischer Endothelzellverlust**

Die Zahl der Endothelzellen der Hornhaut ist neben anderen Faktoren ein ganz wesentlicher Parameter für das Langzeitüberleben und die Klarheit des Transplantates und somit für den Gesamterfolg einer perforierenden Keratoplastik (Böhnke et al.1982, Böhringer 2002). Ein chronischer Endothelzellverlust in Abwesenheit von jeglichen Anzeichen einer Immunreaktion wird gewöhnlich nach jeder perforierenden Keratoplastik beobachtet (Bourne 1994, Ing 1998, Nishimura 1999, Böhringer 2002, Spelsberg 2004). Die Ursache des idiopathischen Endothelzellverlustes ist bislang unklar. Vermutet wird eine schleichende, an der Spaltlampe nicht sichtbare Immunreaktion oder eine apoptotische Reaktion (Reinhard und Sundmacher 2000b). Dieser postoperative Verlust an Transplantatendothelzellen liegt deutlich über der natürlichen altersabhängigen Endothelzellverlustrate nicht transplantierte Hornhäute von nur 0,5% pro Jahr (Yee 1985). So ist ein jährlicher Endothelzellverlust von 7,8% im Zeitraum von 3 bis 5 Jahren nach der Keratoplastik beschrieben (Bourne 1994). Nach 10 Jahren sind dann nur noch 35% der unmittelbar postoperativ vorhandenen Endothelzellen verblieben (Nishimura 1999). In einer homogenen Patientengruppe nach Normalrisiko-Keratoplastik wurde eine negative Auswirkung in Sinne einen steigenden Endothelzellverlust in Abhängigkeit von längerem post-mortem Zeit und hohem Spenderalter gezeigt (Böhringer 2002). Auch eine Migration von Transplantatendothelzellen in Richtung Wirtshornhaut scheint bei, zum Beispiel, bullöser Kerathopathie eine Hauptursache für den erhöhten Endothelzellverlust zu sein (Reinhard 2002a).

### **1.3.7.3. Weitere Eintrübungsursachen**

Zu weiteren Transplantatüberleben-limitierenden Komplikationen neben Immunreaktionen und idiopathischem Endothelzellverlust gehören: durch chronisch erhöhten Augeninnendruck verursachter Transplantatversagen, chronische Oberflächenstörungen des Transplantats, rezidivierende Entzündungen (z.B. Herpes), Endophthalmitis.

## **1.4. Endotoxin**

Der menschliche Organismus wird alltäglich mit gram-negativen Bakterien konfrontiert. Um diese mikrobiellen Gefahr zu kontrollieren, wurden von dem kongenitalen Immunsystem höherer Organismen Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) entwickelt, welcher pathogene Erreger anhand konservierter Strukturen (pathogen associated microbial pattern, PAMP) erkennen und damit das Abwehrsystem aktivieren können. Diese Aktivierung ist im Rahmen einer Entzündungsreaktion mit einer Stimulierung von Immunzellen und der Bildung von biologisch hochaktiven Mediatoren verbunden, die direkt oder indirekt pathogene Keime schädigen können. Als PRRs wurden die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkannt, als PAMPs mikrobielle Strukturen wie Endotoxin, Lipopeptide (LP), Peptidoglycan (PG) und Oligonucleotide (CpG) (Rietschel 2004).

Unter diesen Molekülen repräsentiert Endotoxin das biologisch potenteste Immunstimulans und ist deswegen von besonderem Interesse (Rietschel 1992, 1996).

### **1.4.1. Entdeckung des Endotoxin**

1876 erschien ein Bericht über Fieber von Burion-Sanderson, welcher das Vorhandensein von Fieber-produzierenden Substanzen in verfaultem Fleisch beobachtet hatte, die zum ersten Mal „Pyrogene“ genannt wurden. Der Begriff „Endotoxin“ wurde erstmals 1892 in Deutschland von Richard Pfeiffer benutzt, welcher herausfand, daß der die Cholera auslösende Organismus, *Vibrio cholerae*, ein hitzestabiles Toxin produzierte (Barnett

1998). Mit Hilfe eines thermostabilen Lysats aus *Vibrio cholerae* induzierte Pfeiffer variable pathophysiologische Reaktionen in Meerschweinchen und nannte diesen toxischen Grundbestandteil "Endotoxin", um die neue Substanz von dem bereits allgemein bekannten thermosensitiven proteinösen "Exotoxin" zu unterscheiden (Pfeiffer 1892).

#### **1.4.2. Biologische Auswirkung**

Als Endotoxine werden Lipopolysaccharide (LPS) bezeichnet, die in der äußeren Schicht der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien verankert sind. Endotoxine sind hochmolekulare Komplexe, die beim Zerfall von gramnegativen Bakterien freigesetzt werden, bestehend aus dem Lipid A, dem Kernpolysaccharid (Core) sowie der O-spezifischen Polysaccharidkette. LPS gelangen durch Abgabe von Membranvesikeln durch lebende Bakterien oder beim Absterben der Bakterienzelle ins Milieu. Die toxische Wirkung ist an das Lipid A gekoppelt. Wird Lipid A im Wirtsorganismus freigesetzt, stimuliert es die Bildung von Mediatoren, die klinisch die Endotoxin-Symptomatik bedingen. Der entscheidende zelluläre Wechselwirkungspartner für Endotoxin ist TLR-4. Für eine erfolgreiche Aktivierung von TLR-4 werden jedoch eine Reihe von humoralen und zellulären Kofaktoren wie LPB, CD14, MD-2, CD81 und der MaxiK-Kanal benötigt (Beutler 2003)

Der Infektabwehr dienende physiologische Angriff des Wirts (Heteroaggression) auf mikrobielle Erreger kann jedoch in eine Autoaggression, bei der sich die humoralen und zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems nicht mehr gegen Infekterreger sondern gegen den Wirt richtet, umschlagen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn große Mengen Endotoxin wirksam werden, wenn verschiedene PAMPs gemeinsam mit Endotoxin einen hochtoxischen Synergismus eingehen.

Nach heutigen Vorstellungen bindet LPS an das Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LPB) im Plasma. Dieser Komplex wird auf den CD 14-Rezeptor auf der Monozyten/Makrophagen-Oberfläche übertragen.

Nach Aktivierung einer endogenen membranständigen Protease, die CD 14 abspaltet und freisetzt (sCD14) können auch die Endothelzellen, die keinen CD 14-Rezeptor exprimieren, den sCD 14-Rezeptor an ihre Oberfläche binden und so auf LPS reagieren

(z.B. durch Expression von Adhäsionsmoleküle (Ulevitch RJ 1995). Endotoxin reagiert direkt hauptsächlich mit Monozyten/Makrophagen, wie auch Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und glatten Muskelzellen, die alle verschiedene Mengen endogener Mediatoren produzieren und sezernieren. Zu diesen gehören bioaktive Lipide (platelet-activating factor (PAF) und Thromboxan A<sub>2</sub>), freie Radikale (Stickstoffoxid) und insbesondere Zytokine (Interleukin-1, -6, TNF- $\alpha$ ).

Die Zytokine bewirken im Körper die Akut-Phase-Reaktion mit Fieber, Katabolismus und verstärkter Granulozytenproduktion und -ausschwemmung. Es kommt zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (zuerst Selektinen, dann Integrinen), wodurch Granulozyten an der Gefäßwand in der Herdnähe adhären und später durch die Aktivierung des Komplementsystems (C3a, C5a) entlang eines Konzentrationsgradient in den Entzündungsherd migrieren. Außerdem fördert die Aktivierung des Kinin- und Blutgerinnungssystems und später auch der Fibrinolyse-Kaskade die Anheftung von aktivierten Granulozyten und Thrombozyten vorwiegend an Endothelzellen der Mikrozirkulation (Hahn 1999). Folgen sind irreversible vaskuläre Zerstörung und lokale Gewebeschädigungen, die zum septischen Schock, disseminierter intravasalen Gerinnung und Multiorganversagen führen können (Movat 1987).

Die humanen kornealen Zellen werden entweder direkt durch Endotoxine oder indirekt über Zytokine zur Produktion von Interleukinen (IL) stimuliert. Die Regulierung lokaler entzündlicher Prozesse durch korneale Epithelzellen wird beispielsweise durch IL-1 vermittelt, welches in diesem Zusammenhang zunächst als corneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor (CETAF) beschrieben wurde (Grabner 1982). Weiterhin wurde die Expression von IL-8 mRNA nach Stimulierung mit IL-1 oder TNF in stromalen und endothelialen kornealen Zellen beobachtet (Elner 1991), sowie eine erhöhte Produktion von IL-6 durch alle kornealen Zellen nach Lipopolysaccharid-Stimulus nachgewiesen (Sakamoto 1992).

Am lebenden Auge ist das korneale Gewebe durch die Epithelschicht und die Blut-Kammerwasser-Schranke vor Endotoxinen geschützt. Während der Organkultur der Spenderhornhaut ist diese Funktion aufgehoben (Sobottka Ventura 1998). Wird eine Spenderhornhaut transplantiert, so kann ein Endotoxin aus einem infizierten Kulturmedium in das Auge gelangen und da ein Endophthalmitis oder eine Abstoßungsreaktion triggern.

Zwar ist die Entwicklung einer Endophthalmitis nach einer perforierenden Keratoplastik niedrig und wurde mit 0,77% angegeben, dies liegt aber erheblich höher als bei extrakapsularen Katarakt-Operationen (Hagenah 1996)

Bulbus und Kornea sind von Mikroorganismen kolonisiert und gelten als ursprünglich unsteril (Christiansen 1998). Eine sorgfältige Desinfektion vor der Hornhautentnahme reduziert mögliche Kontamination des kornealen Gewebe und somit des primären Kulturmediums (Sperling 1981, Hagenah 1996). Auch ein Zusatz von Antibiotika in der Organkultur entsprechend den Standards von European Eye Bank Association ermöglicht weitere Minimierung einer Endophthalmitis-Auftreten.

Zum Nachweis von Endotoxinen in Medien dient der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test.

## **1.5. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test**

### **1.5.1. Vorgeschichte und biologisches Prinzip**

*Limulus* Amöbozyten-Lysat ist ein wäßriger Extrakt von Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses, *Limulus polyphemus*.

Die Koagulation von *Limulus*-Blut wurde im Jahre 1885 zuerst von Howell beschrieben (Howell 1885). In den fünfziger Jahren entdeckte Bang im Labor für Meeresbiologie in Woods Hole im US-Bundesstaat Massachusetts, dass gramnegative Bakterien die Koagulation von *Limulus*-Blut verursachen (Bang 1953). Bakterielle Endotoxine eines *Vibrio* führte zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit tödlichem Ausgang für die Spezies (Bang 1956).

Eine ähnliche, durch Endotoxin verursachte Reaktion bei Säugetieren, Sanarelli-Schwarzman-Phänomen, wurde zu diesem Zeitpunkt ausführlich erforscht und beschrieben.

An der Johns Hopkins University begann Bang in Kooperation mit Hämatologe Jack Levin intensive Forschung des *Limulus*-Blut.

Levin und Bang stellten fest, daß es sich um eine enzymatische Reaktion handelt. Die Enzyme befinden sich in den Granula der Amöbozyten (Levin 1964a). Sie zeigten, daß die Gerinnung durch eine einzigartige strukturelle Komponente der Bakterienzellwand, Endotoxin (Levin 1964b) in Gang gesetzt wurde. Heute wird allgemein angenommen, daß

eine kaskadenartig ablaufende Reaktion enzymatischer Aktivierungsschritte zur Gerinnungsbildung führt. Obwohl die komplette Reaktion noch nicht vollständig erforscht ist, ist der letzte Schritt ausführlich beschrieben. Das Gerinnungsprotein (Koagulogen) wird durch aktiviertes Gerinnungsenzym gespalten. Die unlöslichen Spaltprodukte vereinigen sich in einer ionischen Wechselwirkung und bilden die Gel-Matrix (Levin 1968, Novitsky 1984, Watson 1987). Endotoxin wird bei einer Analyse quantifiziert, indem der Endpunkt in einer Serie von Probenverdünnungen bestimmt wird. Die Test-Durchführung und -Beurteilung wurde durch FDA (Food and Drug Administration, US-Bundesbehörde für Lebens- und Arzneimittel in der "Guideline on the Validation and Use of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices" vorgenommen und im Dezember 1987 festgelegt (Department of Health and Human Services 1987).

### **1.5.2. *Limulus polyphemus***

Die heute noch lebenden *Limulus*-Formen sind auf verschiedene Meeresbereiche verteilt. Der amerikanische Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*.) bewohnt die nordamerikanische Atlantikküste, die beiden anderen Gattungen *Trachyleus* and *Carcinoscorpinus* (auch als Molukkenkrebse bezeichnet) sind auf die südostasiatischen Küstengebiete beschränkt. *Limulus* gehört systematisch betrachtet nicht zu einer Krebstier-Gruppe, sondern wird mehr in die Nähe der Spinnen und Skorpione zu gerechnet. Die *Limulus*-ähnlichen Formen gehören im zoologischen System zur Ordnung der Schwertschwänze (Xiphosurida), einer bis ins Silur (440 Millionen Jahre) belegten Gruppe der Gliederfüßer (Arthropoden) (Milne 1873).

Das Meereswasser enthält über eine Billion der gram-negativen Bakterien pro Milliliter, so dass *Limulus* konstant mit der Infektion konfrontiert ist. Bei einem poikilothermen (wechselwarmen) Tier ist es nicht möglich durch Erhöhung der Körpertemperatur zur Bekämpfung Bakterien zu bekämpfen, zudem besitzt es nur ein primitives Immunsystem, das keine Antikörper produziert. Dennoch entwickelte *Limulus* im Laufe der Evolution eine rasche intravasale Gerinnung zur Bindung und Inaktivierung von Bakterien, Pilzen und Viren. Diese Funktion wird durch spezielle Blutzellen des *Limulus*-Amöbozyten erfüllt. Diese besitzen kleine Granula mit einem Gerinnungsfaktor-Koagulogen, welcher

schon bei Kontakt mit geringen Endotoxinmengen abgegeben wird. Die Gerinnungsbildung verhindert das Verbluten und dient gleichzeitig als physikalische Barriere gegen das Fortschreiten der Infektion. Damit nutzt *Limulus* die Endotoxine als Warnsignal für Verletzungen und zu effektiver Abwehr gegen Infektionen. (Quigley 1997, Mürer 1975, Segukuchi 1988). Der *Limulus* Amöbozyten Lysat-Test ist, im Vergleich zu in der Vergangenheit verbreiteten Tests mit Kaninchen, eine einfach und schnell durchführbare, spezifische und höchst sensitive Methode für den Endotoxin-Nachweis (Levin 1968, Hochstei 1987). Bei Produktion des Lysates werden die Tiere nicht getötet. Das Blut wird unter den sterilen Bedingungen aus einem großen dorsalen Sinus entnommen, zentrifugiert, Amöbozyten vom Serum separiert und mit sterilem Wasser verdünnt. Die Spezies werden innerhalb von 24 Stunden ins Wasser gelassen und erholen sich problemlos (Department of Health and Human Services).

## **1.6. Studiendesign und Fragestellung**

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Führen erhöhte Endotoxin-Spiegel zu (signifikantem) Endothelzellverlust in Organkultur?
2. Werden erhöhte Endotoxin-Spiegel unabhängig von der mikrobiologischen Analyse der Kulturmedien gefunden?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Endotoxin-Spiegel und dem beobachteten Endothelzellverlust nach Normalrisikokeratoplastik, sofern dieser nicht auf eine klinisch sichtbare Immunreaktion oder auf chronisch erhöhten Augeninnendruck zurückzuführen ist?
4. Besteht eine Abhängigkeit zwischen Endotoxin-Spiegel und dem Auftreten von Immunreaktionen und wenn ja, welcher Art?
5. Wirken sich Endotoxine in Organkultur auf das Transplantatüberleben aus?

Zwei homogene Patientengruppen wurden untersucht, wobei bei der ersten Gruppe der Endotoxin-Spiegel  $< 1$  U/ml, bei der zweiten Gruppe 1 und mehr U/ml betrug, wobei innerhalb der Gruppen noch zwischen Normal- und Hochrisikokeratoplastiken unterschieden wurde. Nur die Patienten nach einer Normalrisikokeratoplastik haben wir

statistisch analysiert, da der Endothelzellverlust nach Hochriskokeratoplastik durch mehrere Parameter beeinflusst wird und eine alleinige Endotoxinwirkung nicht zweifelsfrei herausgearbeitet werden kann.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Spenderhornhautentnahme, -kultivierung und –evaluation**

Alle Spenderhornhäute wurden unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien (Richtlinien zum Führen einer Hornhautbank, Bundesärztekammer 2000) durch korneosklerale Exzision in situ unter möglichst sterilen Bedingungen entnommen.

Die Spenderscheiben werden in 4° C kaltem Transportmedium (Zusammensetzung wie Kulturmedium II (KM II) (Tab.1) eingebracht und zur Hornhautbanklabor (LIONS Hornhautbank Nordrhein-Westfalen Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) transportiert, wo sie im Kühlschrank bei 4° C bis zur Einbringung in der Kulturmedium in der Laminar-Flow-Einheit (Tab.3) gelagert werden.

Die Korneoskleralscheibe wird im Hornhauthalter nach Böhnke fixiert und anschließend in eine mit 40 ml KM I (mit 2% FCS) gefüllte Kulturflasche eingesetzt. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank (Tab.3) bei 34° C. Außerhalb der Laminar-Flow-Einheit wird die Hornhaut im Behälter auf Vorhandensein von Narben an der Spaltlampe (Tab.3) und Hornhautepithel, -stroma, -endothel unter dem Phasenkontrastmikroskop (Tab.3) untersucht. Täglich wird die Farbe und Klarheit des Mediums der kultivierten Hornhaut überprüft, um Kontamination auszuschließen. Der Wechsel des Kulturmediums I (KM I) erfolgt alle 7-10 Tage in der Laminar-Flow-Einheit. Vor dem Mediumwechsel wird auch die Endothelbeurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. Die Hornhaut wird zur Sichtbarmachung der Endothelzellschicht, indem die extrazelluläre Räume zwischen den Endothelzellen quellen, in einer hypotonen gepufferten Elektrolytlösung (Balanced salt solution) (Tab.2) in einer Untersuchungsschale mit abnehmbarem Deckel in der Laminar-Flow-Einheit umgesetzt, so dass die interzellulären Räume sichtbar werden. Die Hornhaut wird maximal 3 Minuten außerhalb der Lamina-Flow-Einheit unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Es werden sowohl zentral als auch peripher Epithelzellen, Keratozyten und Endothelzellen evaluiert. Insbesondere wird die Struktur der interzellulären Grenzen, Polymorphie und Polymegatismus beurteilt und dokumentiert. Danach wird die Hornhaut erneut in einem Hornhauthalter fixiert, in frisches

KM I umgesetzt und im Brutschrank bei 34° C aufbewahrt. Die maximale Kulturdauer beträgt 30 Tage, in aller Regel etwa jedoch 12-14 Tage. Nach 7 Tage Kulturdauer werden jeweils 5 ml des Primärkulturmediums im mikrobiologischen Institut der Universität Düsseldorf auf aerobe und anaerobe Mikroorganismen mittels Photometrie untersucht. Beim Auftreten einer Trübung wird das Material auf speziellen Nährboden ausgestrichen, kultiviert und identifiziert.

Nur mikrobiologisch sterile Organkulturmedien wurden für diese Arbeit ausgewählt.

Zu transplantationsvorbereitender Entquellung werden die Hornhäute in dextranshaltiges Kulturmedium II (KM II mit 2% fetalem Kälberserum) umgebettet und zwischen 12 Stunden und maximal 4 Tage unter sterilen Bedingungen (in der Lamina-Flow-Einheit) einem Brutschrank bei 34° C bis etwa eine Stunde vor der Keratoplastik kultiviert. Unmittelbar vor der Operation werden die Hornhäute noch mal hinsichtlich ihrer Qualität unter dem Phasenkontrastmikroskop und Spaltlampe beurteilt.

Bei dieser Endbeurteilung wird ein repräsentativer Bildausschnitt des Endothels mit einer an das Mikroskop angeschlossene Polaroidkamera fotografiert. Nach Auflegen eines transparenten Rahmens der Größe 3x3 cm werden alle im Rahmen enthaltenen Zellen sowie die an 2 Rändern angeschnittenen Zellen gezählt. Nach Multiplikation mit einem Faktor, der aus der Vergrößerung errechnet wird, wird die Zelldichte pro mm<sup>2</sup> ermittelt.

Die Freigabe zur Operation erfolgte bei einer regelmäßigen Endothelzellmorphologie mit einer Dichte  $\geq 2000$  Zellen/mm<sup>2</sup>.

Im Rahmen des Mediumwechsels nach 7-tägiger Kulturdauer wurden 1,5 ml vom primären Kulturmedium I und präoperativ von Kulturmedium 2 zur Durchführung der Endotoxin-Untersuchung entnommen und bei -20° C eingefroren.

## **2.2. Endotoxin-Nachweis mit Limulus Amöbozyten Lysat-Tests**

### **2.2.1. Vorbereitungen der Reagenzien**

Verwendet wurde ein Testsystem der Firma BioWittaker nach den Angaben des Herstellers.

Eine Flasche mit lyophilisiertem LAL (Tab.2) 3,0 ml wurde direkt vor dem Testbeginn in 3,0 ml Aqua ad injectabile gelöst. Das chromogene Substrat (Tab.2)  $\approx 7$  mg wurde in 6,5 ml Aqua ad injectabile in einer Konzentration von 2 mM gelöst. Lyophilisiertes E. coli

Endotoxin (Tab.2) 1,0 ml, Endotoxinaktivität 15-30 EU/ml wurde in 1,0 ml warmen Aqua ad injectabile gelöst.

### **2.2.2. Test-Durchführung**

50 µl von den vorliegenden verdünnten Proben (alle Proben wurden 1:10, 6 Proben zusätzlich 1:100 und 1 Probe 1:10.000 verdünnt) von frischen Organkulturmedien I und II und fetalem Kälberserum wurden mit 50 µl LAL-Lösung auf einer Mikrotiterplatte vermischt und bei 37° C im Brutschrank (Tab.3) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der chromogenen Substratlösung hinzugefügt, nach weiteren 6 Minuten wurden 100 µl Stoppreagenz (Essigsäure) (Tab.2) dazugegeben. Bei Vorhandensein von Endotoxin erfolgte ein gelber Farbumschlag. Je höher der Endotoxin-Gehalt in der Probe war, desto intensiver war die Färbung. Die Absorptions-Stärke jeder einzelnen Probe wurde spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 405-410 nm bestimmt. Als Positiv-Kontrolle wurde mitgeliefertes standartisiertes E.coli-Endotoxin verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde steriles Wasser verwendet.

### **2.2.3 Erstellung einer Standard-Kurve**

Der Endotoxingehalt der einzelnen Proben wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve berechnet. Die Standardkurve war in dem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,0 EU/ml linear. Zur Erstellung der Standardkurve wurden 4 Standard-Lösungen verwendet. Nach der Rekonstruktion von lyophilisiertem Endotoxin wurde die Grundlösung mit Endotoxin-Aktivität von 1,0 EU/ml durch Formel  $1/x$  erstellt, wobei  $x$  die von Hersteller vorgegebene Endotoxin-Aktivität war und betrug in verwendeten Kits 27 EU/ml pro Flasche. So war die Grundlösung  $1/27$  oder 0,1 ml von rekonstruiertem Endotoxin gelöst in 2,2 ml Aqua ad injectabile. Die Menge von Aqua ad injectabile wurde durch Formel  $(x-1) / 10$  ml errechnet. Die Lösung mit der Endotoxin-Aktivität von 0,5 EU/ml wurde aus 0,5 ml der Grundlösung (Endotoxin-Aktivität 1,0 EU/ml) und 0,5 ml des Aqua ad injectabile, mit der Endotoxin-Aktivität von 0,25 EU/ml aus 0,5 ml der Grundlösung mit 1,5 ml des Aqua ad injectabile und mit Endotoxin-Aktivität von 0,1 EU/ml aus 0,1 ml der Grundlösung vermischt mit 0,9 ml des Aqua ad injectabile erstellt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Endotoxin-Grundlösungen zum Erstellen einer Standardkurve

Endotoxin-Aktivität EU/ml	Rekonstruierte lyophilisierte Endotoxin- Lösung Ml	Endotoxin- Standardlösung (aus Grundlösung) 1 EU/ml	Aqua ad injectabile ml (x-1) ml/10
1,0 (Grundlösung)	0,1		2,6
0,5		0,5 ml	0,5
0,25		0,5 ml	1,5
0,1		0,1 ml	0,9

Als Leerwert wurde Aqua ad injectabile verwendet, da die Absorption und Endotoxin-Aktivität des sterilen Wasser für Injektionszwecke als 0-Wert angenommen wurde.

Beispielsweise werden folgende Absorptions-Werte in Standard-Lösungen gemessen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Absorptions-Werte in Standard-Lösungen

Endotoxin-Konzentration Standard-Lösung 1 EU/ml	$\Delta$ Absorption
1,0	0,85
0,5	0,426
0,25	0,213
0,1	0,088
0 (Injektionswasser)	0,056

Graphisch dargestellt (Abb.4) wurde eine durch die Messpunkte gelegte Regressionsgerade. An dieser Regressionsgerade wurden die Endotoxin-Aktivitäten der einzelnen Proben aufgrund der gemessenen Absorption (nach Abzug des Leerwertes) abgelesen. Verwendet wurden nur Messungen, bei denen Absorptionen auftraten, die innerhalb der Messpunkte der Regressionsgerade lagen. Traten höhere Absorptionen auf, wurde die Messung mit einer höheren Verdünnung der Probe mit Aqua ad injectabile wiederholt.

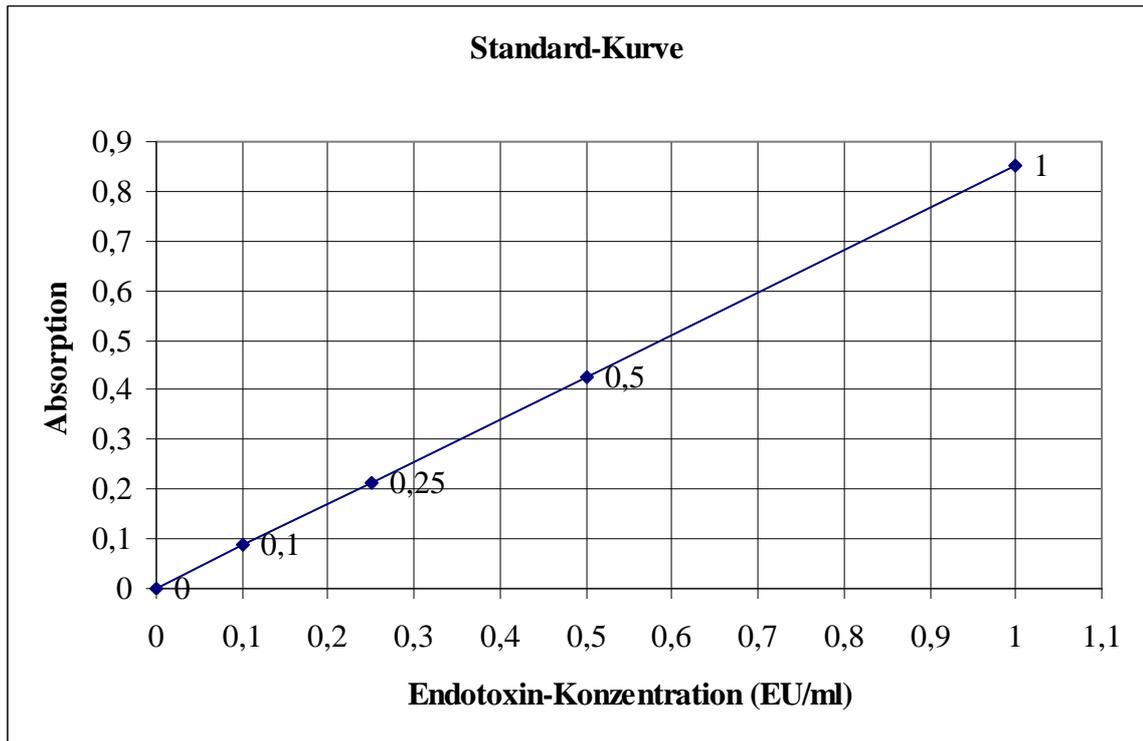


Abbildung 4. Graphische Methode zur Standard-Kurve-Darstellung

### 2.3. Perforierende Keratoplastik

138 Patienten wurden mit Retrobulbäranästhesie, 23 Patienten in Intubationsnarkose (ITN) operiert.

Nach Desinfektion und Spülung des Auges wurde das Gesicht mit sterilen Tüchern abgedeckt. Nach Einsetzen eines Lidserrers wurde der M. rectus superior transkonjunktival angeschlossen und das Auge fixiert. Danach erfolgte eine Parazentese am linken Auge (LA) temporal oder am rechten Auge (RA) nasal.

Die Trepanation wurde mittels modifiziertem Handtrepan nach Franceschetti durchgeführt, zunächst für die Spenderhornhaut zentrisch von der endothelialen Seite nach epithelial (Durchmesser 7,7 mm bei 133 Hornhäuten, Durchmesser > 7,7 bei 25 Hornhäuten) und danach für die Empfängerhornhaut zentrisch von epithelial nach endothelial (Durchmesser 7,5 mm bei 133 Augen, Durchmesser > 7,5 bei 25 Augen). Nach Exzision der Empfängerhornhaut wurde das Transplantat zunächst mit 4 vorläufigen Einzelknopfnähten mit Nylon der Stärke 10-0 bei 3,6,9 und 12 Uhr an der Wirtshornhaut fixiert.

Danach wurde eine doppelt fortlaufende, gegenläufige, gekreuzte Naht nach Hoffmann (Hoffmann 1976) mit 2 mal 8 Durchstichen gelegt. Die Einzelknopfnähte wurden nach

Legen der 1. Naht entfernt. Die Wiederherstellung der Vorderkammer erfolgt mit BSS. Am Ende wurden bei Bedarf zusätzliche randadaptive oder refraktive Einzelknopfnähte zugefügt.

Das Auge wurde mit einem Mono-Pad und Gentamicinsulfat Augensalbe 5% verbunden.

#### **2.4. Postoperative Behandlung**

Am Operationstag erfolgte ein erster Verbandswechsel mit Gentamicinsulfat Augensalbe 5%. An den darauf folgenden Tagen erhielten alle Patienten lokal Antibiotika (Gentamicin 0,5% AS) 5 x tgl. bis zum Epithelschluß, anschließend lokale Steroide (Prednisolon-21-acetat 1% Augentropfen) 5 x tgl., sowie Tränenersatzmittel 5 x tgl. Die Frequenz der Steroidapplikation wurde monatlich um 1 Tropfen reduziert (Reinhard 1997). Bei Hochrisikokeratoplastik wurde die Applikation von 1-2 Tropfen Steroide dauerhaft fortgeführt. Unmittelbar postoperativ wurden zusätzlich systemische Steroide verabreicht, beginnend mit Fluocortolon 1 mg/kg/KG, das innerhalb von 3 Wochen in regelmäßigen Schritten langsam reduziert und beendet wurde. Bei Hochrisiko-Patienten wurde in Abhängigkeit von der Ausgangssituation eine zusätzlich systemische Immunsuppression mit Cyclosporin A (Sandimmun®) und/oder mit Mycophenolat mofetil (CellCept®) nach vorheriger internistisch/nephrologischen Untersuchung auf bestehende Leber-, Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen verabreicht. Bei ursprünglicher Herpes-Erkrankung wurde zusätzlich systemisch Aciclovir (Zovirax®) mit einer Tagesdosis von 1000 mg verordnet. Diese Behandlung erfolgte für mindestens 6 Monate. Die Dosierung von Cyclosporin A erfolgte nach Bestimmung des Blutspiegels (12 Stunden nach letzter Einnahme); der Zielwert lag bei 120-150 mg/ml, gemessen mit der monoklonalen TDX-RIA (Pescovitz 1992).

Die Therapie mit Mycophenolat mofetil wurde mit einer feste Dosis von 2 x 1g täglich für mindestens 6 Monate verabreicht.

Abhängig von Transplantat-Astigmatismus wurden der erste fortlaufende Faden postoperativ nach frühestens 4 bis 6 Monate und der zweite nach frühestens 12 bis 18 Monate in Tropfanästhesie mit Proxymetacain 0,5% Augentropfen entfernt.

## **2.5. Postoperative Kontrollen**

Postoperative Kontrolluntersuchungen wurden nach sechs Wochen, vier und zwölf Monaten sowie danach einmal jährlich durchgeführt.

## **2.6. Behandlung der Immunreaktionen**

Die Diagnostik der Immunreaktionen wurde gemäß den in Kapitel 1.3.5.1 definierten Kriterien durchgeführt. Bei akuten 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 chronisch endothelialen und stromalen Immunreaktionen wurden fünfmal Prednisolon-21-acetat 1% AT täglich verordnet, die ebenfalls in Abhängigkeit vom individuellen klinischen Befund langsam reduziert wurden.

## **2.6. Untersuchungsablauf**

Bei jedem Patienten wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Bestimmung der Refraktion (Brille, Autorefraktometer, subjektiver Ausgleich)
- Spaltlampenuntersuchung: Dokumentation von Lid- und Bindehautzustand, Hornhauttransparenz, Vorderkammertiefe, Lichtweg, Iris und Augenlinse/ Intraokularlinse
- Bestimmung der Endothelzelldichte (siehe unten)
- Schätzung des intraokularen Druckes (palpatorisch) durch Vergleich mit der applanatorischen Messung am Partnerauge.

## **2.7. Evaluierung der Endothelzelldichte**

Die postoperative Endothelzelldichte wurde mit Hilfe eines Non-contact-Spegelmikroskop (Tab.7) ermittelt. Dieses System ermöglicht dem Untersucher halb-automatisch die zentrale Endothelzelldichte zuverlässig und korrekt zu kalkulieren (Landesz 1995). Mindestens 30 Zellen pro Ablichtung sollen für den halb-automatischen Algorithmus

markiert werden. Für die postoperative Endothelzellverlust-Analyse wurde eine Endothelzellzahl nach 4 -6 Monaten und 3-3,5 Jahren (eine Differenz zwischen Zellzahl nach dem 4ten-6ten und nach den 3-3,5 Jahren dividiert durch Zellzahl nach dem 4ten-6ten Monat) in Prozenten pro Patient errechnet.

## **2.8. Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS 10.0 (Microsoft Corp., Redmond, USA) durchgeführt. Die Prüfung der Interdependenz von häufig vorkommenden Daten wurde mit Hilfe exakten Fisher-Tests oder  $\chi^2$ -Tests (Pearson) durchgeführt. Die metrischen Daten wurden an Hand von klassischem zweiseitigem T-Test für die unabhängige Proben verglichen. Die Kalkulation der Keratoplastik-Daten (Immunreaktion, klares Transplantatüberleben) wurde durch Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ermittelt und mit Log-Rang-Test für statistische Signifikanz evaluiert (p-Wert < 0,05).

## **2.9. Materialien**

Für die Herstellung von jeweils 1000 ml der Organkulturmedien I und II wurden folgende Chemikalien verwendet: Minimal Essential Medium mit Eales Salzen 10%, HEPES Pufferlösung 1M 1,25%, Natriumhydrogencarbonat 7,5%, L-Glutamin Lösung 200mM 1%, Amphotericin B 2,5 mg/ml, Penicillin 100 IE/ml, Streptomycin 100 µg/ml, 2% FCS, Aqua ad injectabile ad 1000,0 ml. KM II enthielt zusätzlich 6% Dextran T500 Lösung (Tabelle 5).

Tabelle 5. Organkulturmedium (KM)

Ansätze	KM I	KM II	Hersteller
Minimal Essential Medium mit Earles Salzen	100,00 ml	100,00 ml	Fa. BioWhittaker 12/684F
Hepes Pufferlösung (1M)	12,50 ml	12,50 ml	Fa. BioWhittaker 17/737E
Natriumhydrogencarbonat	29,30 ml	29,30 ml	Fa. BioWhittaker 17/613E
L-Glutamin Lösung 200mM	10,00 ml	10,00 ml	Fa. BioWhittaker 17/605E
Amphotericin B Lösung 250 µg/ml	10,00 ml	10,00 ml	Fa. Serva 49782
Penicillin/Streptomycin Lösung 10000 IE/10000 µg/ml	10,00 ml	10,00 ml	Fa. BioWhittaker 17/602E
Aqua ad inject	ad 1000,00 ml	ad 1000,00 ml	Fa. Clintec-Salvia
Dextran T500 Lösung 6%		600,00 g	Fa. Sigma angereichert über Apotheke Uni-Klinik Düsseldorf
Membranfilter	0,2 µm	0,45 µm	
Zusatz zur Organkulturmedium:			
2 % Fetales Kälberserum Charge Nr. 14846902 Herkunftsland: Chile			Fa. Boehringer, Mannheim GmbH, Deutschland
Inhalt 1 Flasche: 85 ml Die Medien werden aseptisch hergestellt, durch Membranfilter filtriert, portioniert, in sterilen Nalgene-Flaschen 125 ml abgefüllt und bei -20° C gelagert.			Hergestellt durch Hof Apotheke, Kiel

Tabelle 6. Chemikalien

Lymulus Amebocyte Lysate QCL-1000®	chromogenic LAL 300 Test Kit Product Number 50-648U	Fa. BioWhittaker, Walkersville, MD, USA
Zu dem Test Kit gehörende Reagenzien: Limulus Amöbozytenlysat	5 Flaschen mit lyophilisiertem Lysat aus Limulus polyphemus	
Chromogenes Substrat	5 Flaschen jeweils mit 7 mg sterilem lyophilisiertem Substrat	
E.coli Endotoxin (0111:B4)	2 Flaschen mit lyophilisiertem Endotoxin (vorgegebene Aktivität 27 EU/ml)	
PBS-Puffer(pH 7,3): NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O KCL	8 g/l 0,2 g/l 1,3 g/l 0,2 g/l	
Stopreagenzien: Äthansäure (CH <sub>2</sub> COOH) x 4 H <sub>2</sub> O SDS-Probenpuffer: Upper-Tris Glycerin DTT Brophenolblau	100 mM 20 % 200 mM 0,2 %	
Aqua ad injectabile		

Tabelle 7. Geräte

Phasenkontrast-Mikroskop	Fluovert FU, Fa. Leitz
Spiegelmikroskop	Konan Noncon Robo 800, Konan Inc, Nashinomiya, Hyogo, Japan
Spaltlampe	M 9004907, Fa. Haag-Streit, Bern, Schweiz
Lamina-Flow-Einheit	Gelaire BSB 3A, Flow Laboratories, Opera
Brutschrank (HHB)	Mahlberg Jouan GmbH, Dienslaken, Deutschland
EIA-Reader	Labsystems, Frankfurt, Deutschland

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Mittlere Endotoxin-Konzentration der Negativ-Kontrollen

Wir haben Endotoxin-Konzentration zuerst in primären Organkulturmedien, fetalem Kälberserum im Kühlschrank und im Brutschrank getestet (Tabelle 8).

Tabelle 8. Endotoxin-Konzentration in primären Organkulturmedien und fetalem Kälberserum

Reagenzien	Endotoxin-Konzentration (Units/ml)				
		KM 1 Charge1	KM 1 Charge 2	KM 1 Charge 3	KM 2
KM im Kühlschrank		1,07	1,68	1,09	1,35
FCS im Kühlschrank	102,0				
KM im Brutschrank		0,1	0,3	0,1	0,4
FCS im Brutschrank	59,0				
KM + FCS in einer Kultivierungsflasche im Brutschrank		0,9	2,2	1,4	2,0
KM + FCS in einer Kultivierungsflasche mit Hornhauthalter im Brutschrank		1,0	3,0	0,5	2,6
KM – Kulturmedium, FCS - Fetales Kälberserum					

Der mittlere Endotoxinwert in KM 1 lag bei allen Hornhäuten bei  $2,38 \pm 6,1$  ( $<1$  (in der Statistik als 0,9 definiert) - 41) U/ml, in KM 2  $1,39 \pm 0,48$  ( $<1$ - 3,0). Die Werte zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test bei gepaarten Stichproben,  $p = 0,09$ ) (Tab. 9).

Tabelle 9. Mittlerer Endotoxinwert in KM 1- und KM 2-Proben

	KM 1	KM 2
Mittelwert (U/ml)	$2,38 \pm 6,1$ (0,9-41)	$1,39 \pm 0,48$ (0,9-3,0)

Wenn wir in KM 1- und KM 2-Gruppe die Endotoxin-Werte bei transplantierten und verworfenen Hornhäuten vergleichen, dann zeigte sich in KM 1 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den transplantierten und verworfenen Hornhäuten (Eta-Quadrat,  $p = 0,005$ ), in KM 2 waren die Mittelwerte zwischen den beiden Gruppen vergleichbar, obwohl keine Statistik möglich war, da bei verworfenen Hornhäuten wir nur 8 KM 2-Proben hatten. (1 verworfene Probe mit Endotoxin-Konzentration in KM 1 von 7000,0 U/ml war schon optisch trüb und wurde hier bei der Analyse nicht berücksichtigt) (Tab. 10).

Tabelle 10. Mittlerer Endotoxinwert bei transplantierten und verworfenen Hornhäuten

	KM 1	KM 2
Transplantiert (U/ml)	$1,52 \pm 2,45 (0,9-23)$	$1,39 \pm 0,49 (0,9-3,0)$
Verworfen (U/ml)	$2,15 \pm 5,6 (0,9-41)$	$1,25 \pm 0,33 (0,9-1,8)$

### 3.2. Verworfene Hornhäute

117 Hornhäute wurden nach KM 1 verworfen, 8 wurden in KM 2 umgesetzt und dann bei präoperativer Evaluierung verworfen. Die Verwerfungsursachen sind in der Tabelle 2 aufgeführt. In der KM 1 waren 73 Proben mit Endotoxin-Konzentration  $< 1$  U/ml, 52 Proben mit  $\geq 1$  U/ml, die mittlere Endotoxinkonzentration lag bei  $2,15 \pm 5,6 (0,9-41)$  U/ml. In der KM 2 waren 2 Proben mit Endotoxin-Konzentration  $< 1$  U/ml, 6 Proben mit  $\geq 1$  U/ml, die mittlere Endotoxinkonzentration lag bei  $1,25 \pm 0,33 (0,9-1,8)$  (Tabelle 11).

Tabelle 11. Mittlerer Endotoxinwert bei verworfenen Hornhäuten

Verworfenen HH	KM 1		KM 2	
Endotoxin-Konzentration (U/ml)	<1	=>1	<1	=>1
Probenzahl	73 (58,9%)	52 (40,2%)	2 (25%)	6 (75%)
Mittlere Endotoxin-Konzentration (U/ml)	2,15 ± 5,6 (0,9-41) (1 Probe mit 7000,0 U/ml wurde nicht berücksichtigt)		1,25 ± 0,33 (0,9-1,8)	
Gesamt (N)	125		8	

### 3.3. Transplantierte Hornhäute

Von 158 Patienten wurden 147 KM 1-Proben und 95 KM 2-Proben untersucht, wobei bei 11 Patienten nur KM2-Proben und bei 84 Patienten KM 1 und KM 2-Proben vorlagen. Bei KM 1-Proben waren 91 mit Endotoxin-Konzentration unter 1 U/ml, 56 mit Endotoxin  $\geq$  1 (1-26 U/ml). Bei KM 2 –Proben waren 24 mit Endotoxin-Konzentration unter 1 U/ml, 71 mit Endotoxin  $\geq$  1 (1-3 U/ml). Mittlere Endotoxin-Konzentration war in KM 1- Proben von transplantierten Hornhäuten 1,52 U/ml  $\pm$  2,45 (0,9-26) und in KM 2-Proben 1,39 U/ml  $\pm$  0,49 (0,9-3,0). Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen Endotoxin-Konzentration in KM 1 und KM 2 vor (t-test, p= 0,57) (Tab. 12).

Tabelle 12. Mittlerer Endotoxinwert bei transplantierten Hornhäuten

Transplantierte HH	KM 1		KM 2	
Endotoxin-Konzentration (U/ml)	<1	=>1	<1	=>1
Probenzahl	91 (61,9 %)	56 (38,1%)	24 (25,3%)	71 (74,7%)
Mittlere Endotoxin-Konzentration (U/ml)	1,52 ± 2,45 (0,9-23)		1,39 ± 0,49 (0,9-3,0)	
Gesamt (N)	147		95	

Von 158 Patienten wurden 141 Patienten nachbeobachtet, 17 Patienten sind zu Nachkontrollen nicht erschienen. Die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse wurde für 5 Jahre-Nachbeobachtungszeit berechnet (Tabelle 13).

Tabelle 13. mittlere Nachbeobachtungszahl

Risikogruppe	Nachbeobachtungszeit (Monate)	Gesamtzahl
Normalrisiko	43,5 ± 28, 67 (1,3-92,8)	94
Hochrisiko	45,5 ± 23, 4 (5,1-95,9)	47

Nur die Patienten aus Normalrisikogruppe wurden hier ausführlich statistisch ausgewertet, Die Patienten von Hochrisikogruppen wurden hier nur beschrieben, statistisch aber nicht analysiert.

Aus der Normalrisikogruppe sind 5 von 94 Patienten zu Nachkontrolle nicht erschienen.

Bei 89 Patienten lagen KM 1-Proben und bei 57 Patienten KM2-Proben vor (Tabelle 14).

Tabelle 14. Zahl der Proben und mittlere Endotoxin-Konzentration bei Normalrisiko-Patienten

	Endotoxin- Konzentration<1 U/ml	Endotoxin- Konzentration=>1 U/ml	Mittlere Endotoxin- Konzentration	Gesamt
KM 1	55	34	1,5	89
KM2	17	40	1,3	57

Der Unterschied in Endotoxin-Konzentration in KM 1 und KM 2 war statistisch nicht signifikant (t-test, p= 0,57).

Bei Untergruppenanalyse in KM 1 und KM 2 war die Endotoxin-Konzentration <1 U/ml und =>1 U/ml unabhängig von folgenden Parametern: Patientenalter, Patientengeschlecht, mittlerer Nachbeobachtungszeit, Spenderalter, Spendergeschlecht,

Post-mortem-Zeit, mittlerer Kulturdauer, mittlerer präoperative Endothelzellzahl, HLA-Mismatch (Tabelle 14 und 15).

Tabelle 14. Daten von KM 1- Proben

KM 1	Endotoxin-Konzentration<1 U/ml	Endotoxin-Konzentration=>1 U/ml	Signifikanz	Test
Patientenalter (Jahre)	53,5	60,3	NS (0,14)	t-test
Patientengeschlecht	Männlich 26/55 Weiblich 29/55	Männlich 15/34 Weiblich 19/34	NS (0,47)	$\chi^2$
Mittlere Nachbeobachtungszeit (Monate)	40,1	50,7	NS (0,9)	t-test
Spenderalter (Jahre)	56,7	61,3	NS (0,3)	t-test
Spendergeschlecht	Männlich 37/55 Weiblich 18/55	Männlich 19/34 Weiblich 15/34	NS (0,19)	$\chi^2$
Post-mortem-Zeit (Stunden)	22,2	19,9	NS (0,58)	t-test
Mittlere Kulturdauer (Tage)	18,1	17,5	NS (0,56)	t-test
Mittlere präoperative Endothelzellzahl (Zellen/mm <sup>2</sup> )	2283	2265	NS (0,71)	t-test
HLA-Mismatch (A/B/DR) 0-2/3-6/ nicht gematcht/ keine Daten	7/29/16/3	6/21/7/0	NS (0,37)	$\chi^2$
NS: nicht signifikant				

Tabelle 15. Daten von KM 2- Proben

KM 2	Endotoxin-Konzentration<1 U/ml	Endotoxin-Konzentration=>1 U/ml	Signifikanz	Test
Patientenalter (Jahre)	44,7	59,2	NS (0,02)	t-test
Patientengeschlecht	Männlich 8/17 Weiblich 9/17	Männlich 16/40 Weiblich 24/40	NS (0,4)	x <sup>2</sup>
Mittlere Nachbeobachtungszeit (Monate)	53,4	36,7	NS (0,9)	t-test
Spenderalter (Jahre)	54,2	57,2	NS (0,59)	t-test
Spendergeschlecht	Männlich 14/17 Weiblich 3/17	Männlich 22/40 Weiblich 18/40	NS (0,04)	x <sup>2</sup>
Post-mortem-Zeit (Stunden)	22,3	16,5	NS (0,27)	t-test
Mittlere Kulturdauer (Tage)	19,6	17,1	NS (0,03)	t-test
Mittlere präoperative Endothelzellzahl (Zellen/mm <sup>2</sup> )	2275	2258	NS (0,7)	t-test
HLA-Mismatch (A/B/DR) 0-2/3-6/ nicht gematcht/ keine Daten	2/8/6/1	5/21/8/6	NS(0,56)	x <sup>2</sup>
NS: nicht signifikant				

Wir haben den Endothelzellverlust 3 Jahren  $\pm$  6 Mo. nach der Keratoplastik in der Normalrisiko-Gruppe bei 68 Patienten berechnet.

Ein relativer Endothelzellverlust (RelEZDVerlust) haben wir, wie im Kapitel 2.8 beschrieben, nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\text{RelEZDVerlust} = (\text{EZD1} - \text{EZD 2}) / \text{EZD1} \times 100 \%$$

(EZD 1- Endothelzellzahl nach 4ten-6ten Monat postoperativ, EZD 2 – Endothelzellzahl nach 3-3,5 Jahren)

Der Mittelwert des RelEZDVerlustes in der Normalrisikogruppe lag bei Transplantaten mit und ohne Immunreaktion bei  $31,16 \pm 23,5$  % nach 3 Jahren.

Der relative Endothelzellverlust in Abhängigkeit von folgenden Parametern in der gesamten Normalrisiko-Gruppe zeigte folgende Signifikanz (Tabelle 16).

Tabelle 16. Statistische Analyse in Abhängigkeit von Patientenalter, Spenderalter, Patientengeschlecht, Spendergeschlecht, post-mortem-Zeit, Todesursache, Kulturdauer, HLA-Mismatch in der gesamten Normalrisiko-Gruppe

Parameter	Signifikanz (p-value)
Patientenalter	NS (0,689)
Spenderalter	NS (0,24)
Patientengeschlecht	NS (0,29)
Spendergeschlecht	NS (0,25)
post-mortem-Zeit	S (0,005)
Todesursache	NS (0,303)
Kulturdauer	NS (0,163)
HLA-Mismatch (0-1/2-6/nicht gematcht)	NS (0,207)

In der KM 1-Gruppe hatten 66 von 89 Patienten ein Endothelzellzahl-Wert nach 4tem-6tem Monat postoperativ und ein Endothelzell-Wert nach 3 Jahren postoperativ. In der KM 2-Gruppe hatten diese Werte 40 von 57 Patienten.

Wir haben die Abhängigkeit von relativem Endothelzellverlust von mehreren Parametern: Patientenalter, Spenderalter, Patientengeschlecht, Spendergeschlecht, post-mortem-Zeit, Todesursache, Kulturdauer, HLA-Mismatch (0-1/2-6/nicht gematcht), Transpalntatgröße getestet. In allen Fällen zeigte sich kein in KM 1- und KM 2-Gruppe kein signifikanter Unterschied der getesteten Variablen von der Endotoxin-Konzentration. (Tabelle 17)

Tabelle 17. Statistische Analyse in Unterguppen mit Endotoxin- Konzentration <1 und =>1 U/ml in KM 1 und KM 2- Gruppen in Abhängigkeit von Patientenalter, Spenderalter, Patientengeschlecht, Spendergeschlecht, post-mortem-Zeit, Todesursache, Kulturdauer, HLA-Mismatch.

	KM 1		KM 2	
	<1	=>1	<1	=>1
Endotoxin-Konzentration (U/ml)	<1	=>1	<1	=>1
ReLEZDVerlust (Mittelwert, % )	31,58	30,94	30,98	26,37
Signifikanz zwischen den Unterguppen	NS (0,9)		NS (0,5)	

Von 89 Patienten hatten insgesamt 9 (10,11 %) eine Abstoßung, 5 davon hatten ein irreversibles Transplantatversagen, 4 weitere Transplantate sind wegen anderen Ursachen eingetrübt (Tab 19).

Von diesen lag Endotoxin-Konzentration <1 U/ml bei 6 Patienten und =>1 U/ml bei 3 Patienten ohne statistisch signifikanten Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p = 0,52$ ) (Tab 18). Ein irreversibles Transplantatversagen hatten 4 Patienten mit Endotoxin-Konzentration <1 U/ml und 5 Patienten mit Endotoxin-Konzentration =>1 U/ml ohne statistisch signifikanten Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p = 0,29$ ) (Tab. 18).

In der KM 2-Gruppe hatten 1 Patient eine Abstoßung mit Endotoxin-Konzentration < 1 U/ml und 3 Patienten mit Endotoxin-Konzentration =>1 U/ml ohne statistisch signifikanten Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p = 0,65$ ) (Tab. 18). Ein irreversibles Transplantatversagen hatten 3 Patienten mit Endotoxin-Konzentration <1 U/ml und 3 Patienten mit Endotoxin-Konzentration =>1 U/ml ohne statistisch signifikanten Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p = 0,24$ ) (Tabelle 18).

Tabelle 18. Abstoßungsreaktionen und irreversibles Transplantatversagen in Unterguppen mit Endotoxin- Konzentration <1 und =>1 U/ml in KM 1 und KM 2- Gruppen

	KM 1		KM 2	
	<1	=>1	<1	=>1
Endotoxin- Konzentration (U/ml)				
Abstoßungsreaktion	6/55	3/34	1/17	3/40
Signifikanz	(p = 0,52)		(p = 0,65)	
Irreversibles Transplantat- versagen	4/55	5/34	3/17	5/40
Signifikanz	NS (p = 0,29)		NS (p = 0,24)	

Der Mittelwert des RelEZDVerlustes lag bei Patienten mit Immunreaktion bei  $52,78 \pm 13,17$  % und ohne Immunreaktion bei  $29,81 \pm 23,40$  % zeigten (Abbildung 5 und 6).

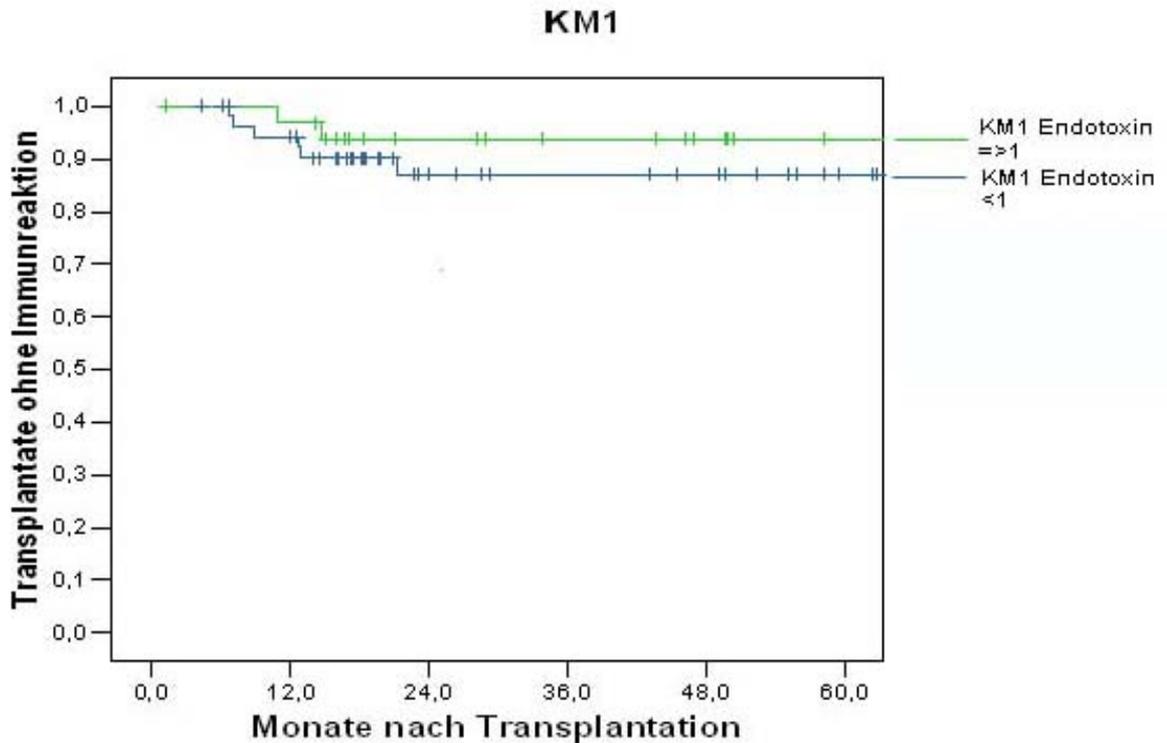


Abbildung 5. Anteile der Transplantate ohne Immunreaktion in KM 1 nach Normalrisikokeratoplastik (Log-Rank-Test, p= 0,636)

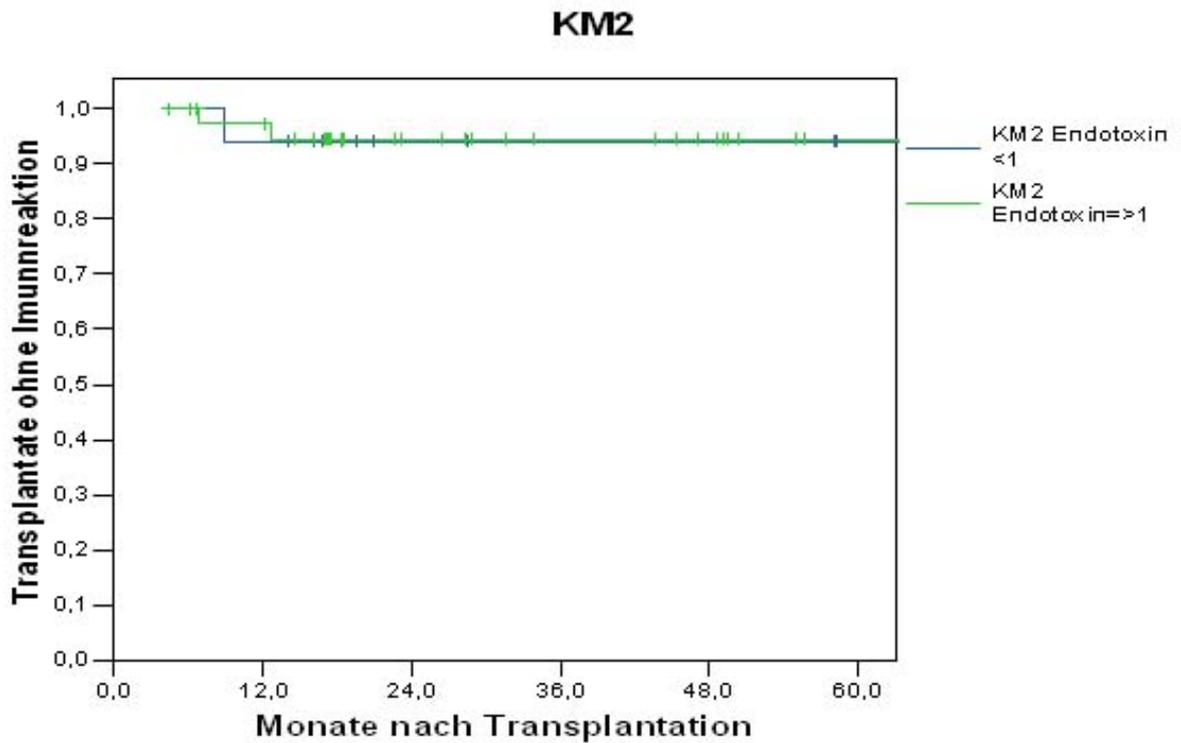


Abbildung 6. Anteile der Transplantate ohne Immunreaktion in KM 2 nach Normalrisikokeratoplastik (Log-Rank-Test,  $p= 0,404$ ).

Das irreversible Transplantatversagen trat aufgrund folgender Ursachen auf (Tabelle 19)

Tabelle 19. Ursachen für das irreversible Transplantatversagen.

	KM 1		KM 2	
	<1	=>1	<1	=>1
Endotoxin-Konzentration (U/ml)				
Immunreaktion	3	2	2	2
Druck-dekompensation	1	2	1	2
Oberflächenproblematik	0	1	0	1
Endophthalmitis	0	0	0	0

#### 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war den Einfluss von Endotoxin-Konzentration in den Organkulturmedien der humanen Hornhaut-Transplantate auf den postoperativen Endothelzellverlust nach perforierender Keratoplastik zu zeigen. Insbesondere sollte die Inzidenz von Immunreaktionen und Endophthalmitis betrachtet werden.

Bei Gesunden besteht immer eine mikrobielle Besiedlung der Konjunktiva. Diese steigt schon bei kurzen Unterbrechungen des normalen Tränenflusses durch lokale Anästhesie oder durch die Aufhebung des Lidschlußreflexes bei Vollnarkose an. Hieraus folgend werden die Spenderbulbi als prinzipiell kontaminiert angesehen (Sperling 1981, Hagenah 1996). In den sterilen Hornhautorgankulturmedien nachgewiesene Endotoxine könnten aus postmortalen Kontamination von Spendergewebe mit nichtreplizierenden Bakterien stammen (Sobottka Ventura 1997). Die Desinfektionsprozedur während der Entnahme sowie der übliche Antibiotikazusatz führen somit zu einer starken Keimreduktion am Beginn der Kultur (Garweg 1989, Hagenah 1995). Eine vollständige Elimination von Endotoxin kann jedoch nicht erreicht werden (Sobottka Ventura 1998).

Die Kontaminationsrate mit E.coli-Endotoxin in Organkulturmedien liegt bei 14 bis 50 % in Abhängigkeit von der Hornhautbank (Sobottka Ventura 1997). In dieser Arbeit wurde ein Organkulturmedium als steril eingestuft, falls die Endotoxin-Konzentration nicht über 0,6 units/ml (U/ml) lag. In einer weiteren experimentellen Arbeit wurde ermittelt, daß hohe Konzentration von E.coli-Endotoxin (25 000 U/ml) in Organkulturmedien durch Anstieg von Interleukin- 6 und -8 einen schädigenden Effekt mit morphologischen Veränderungen auf das Hornhautendothel hat und zu einem signifikanten Endothelzellverlust führt (Sobottka Ventura 1997). So zeigte sich in unserer Arbeit bei verworfenen Hornhäuten eine signifikant höhere Endotoxin-Konzentration in KM 1 als bei transplantierten Hornhäuten, so dass eine Endotoxin-induzierte Endothelzellzerstörung hier anzunehmen ist. Die Aktivierung von Interleukin-6 und -8 beweist, dass durch Endotoxin eine Stimulation von autokriner Funktion der menschlichen Hornhautgewebe erfolgt, was mit gestiegenem Endothelzellverlust korreliert (Sobottka Ventura 1997). Dieser Prozess kann mit erhöhter Expression von HLA-II-Antigenen zusammenhängen (Kim 1986). Daraus resultiert sich eine erhöhte primäre Immunogenität des Hornhaut-Transplantates mit erhöhtem Abstoßungs-Risiko nach einer perforierenden Keratoplastik (Sobottka Ventura 1997, Spelsberg 2004).

In den sterilen Organkulturmedien, die unter Standardbedingungen in den Hornhautbanken benutzt werden, lag die Endotoxin-Konzentration zwischen 0,35 und 0,75 U/ml unabhängig von der Lagerungsart (Sobottka Ventura 1997, 1999). In unserer Studie lag die Endotoxin-Konzentration in den sterilen Organkulturmedien mit 1,07 - 1,68 U/ml etwas höher, sodass wir Kulturmedien-Proben mit Endotoxin-Konzentration  $<1$  U/ml als steril definiert haben. Daraus wird ersichtlich, dass Endotoxin-Niveau in den Proben, die in den Experimenten bearbeitet wurden, mindestens 5 logarithmischen Einheiten höher waren, als in den Organkulturmedien unter Standardbedingungen der Hornhautbank: die zugesetzten Antibiotika verhindern die pathogene Proliferation von Bakterien und entsprechend die Freisetzung von Endotoxin (Spelsberg 2004).

Während der Kultivierungszeit sind die Spenderhornhäute einer weiteren Verkeimungsgefahr durch den Kulturmediumswechsel und Untersuchungen ausgesetzt. Zusätzlich bewirkt die relativ hohe mittlere Temperatur der Organkulturen ein beschleunigtes Wachstum von Bakterien (Garweg 1989).

Eine Endotoxin-induzierte Endothelzellschädigung wurde auch in den Hornhäuten von Schweinen gezeigt, wobei zwischen 6250 U/ml und 25000 U/ml keinen signifikanten Unterschied gefunden wurde. Auch ein Zusatz von fetalem Kälberserum in Organkulturmedium, das primär Endotoxin enthält, kann die Endothelzellschädigung hervorrufen (Sobottka Ventura 1999). Wenn man aber grundsätzlich von einer protektiven Wirkung des fetalen Kälberserums auf die Endothelzellen ausgeht, kann eine potentielle Gefahr der Endotoxin-induzierten Endothelzellschädigung als gering eingeschätzt werden (Spelsberg 2004).

In unserer Studie war die Endotoxin-Konzentration von primärem Kälberserum aus dem Kühlschrank 102 U/ml, nach Erwärmung im Brutschrank lag der Wert bei 59 U/ml und nach der Zugabe in das Kulturmedium (2%) bei 1- 3,0 U/ml. Auch in primären Kulturmedien 1 und 2 zeigte sich eine Senkung von Endotoxin-Werten nach dem Auftauen in dem Brutschrank. Wir haben gezielt 5 zufällige Kulturmedien-Proben 2 Mal eingefroren und aufgetaut. Nach jedem Vorgang wurde die Endotoxin-Konzentration gemessen. Bei allen Proben zeigten sich deutlich niedrigere Endotoxin-Werte bei  $+34^{\circ}$  als bei  $+6^{\circ}$ , sodass wir von einer Adhäsion der Endotoxin-Moleküle an den Plastikwänden von Eppendorf-Fläschchen ausgehen (die Ergebnisse von diesem Versuch wurden hier nicht erläutert). Wir haben diesbezüglich dann keine weitere Untersuchungen unternommen.

Wie schon oben beschrieben wurde, besteht bei jeder weiteren Manipulation mit Organkulturmedien die Gefahr von erneuter bakterieller Besiedlung mit daraus folgendem Endotoxin-Anstieg. Sobottka Ventura hatte keine erhöhte Kontaminationsrate mit Endotoxin nach Wechsel des Kulturmediums gezeigt (Sobottka Ventura 1999). In unsere Studie lag der mittlere Endotoxin-Werte in 203 KM 1-Proben bei  $2,38 \pm 6,1$  (<1-41) U/ml, wobei 4 Ausreißer-Proben mit deutlich hohem Endotoxin-Wert von 23, 27, 38, 41 U/ml die Statistik verzerren. Eine Probe mit 7000 U/ml war zwar als mikrobiologisch steril eingeordnet, aber optisch trüb und wurde in der Statistik nicht aufgenommen. Nur die Probe mit 27 U/ml zeigte im Phasenkontrastmikroskop eine deutliche Endothelzellschädigung und wurde verworfen. In 109 KM 2 Proben war der mittlere Endotoxin-Wert mit  $1,39 \pm 0,48$  (0,9-3,0) U/ml niedriger als in KM 1 Proben, was einerseits mit der effektiven Therapie mit Antibiotika in der KM 1, andererseits mit dem oben beschriebenen Ausreißer zusammenhängt (wenn diese 4 Ausreißer-Werte nicht beachtet werden, liegt die Endotoxin-Konzentration in KM 1 bei  $1,25 \pm 0,69$  (<1-5,3 U/ml).

Die Endotoxin-Werte in KM 1 - Proben zeigen ein Zustand nach 7-tägiger Kultivierung und Einwirkung von Antibiotika bei primärer Keimbesiedlung nach der Entnahme. Danach folgten, wie in dem Kapitel 2.1.1 beschrieben, eine Evaluierung der Endothel-Qualität und eine Umsetzung in KM 2. Zwar verlaufen alle Manipulationen unter sterilen Bedingungen, eine Kontamination kann aber nie ausgeschlossen werden. In KM 2 ist die Hornhaut erneut der Einwirkung von Antibiotika ausgesetzt, sodass schließlich die KM 2 – Proben, die unmittelbare präoperative Endotoxin-Konzentration nach Verdünnung anzeigt. In dieser Arbeit haben wir dann parallel die statistische Auswertung für KM 1 und KM 2 durchgeführt, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Endotoxin-Konzentration in KM 1 und KM 2 bei allen transplantierten Hornhäuten festgestellt wurde.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit für das gesamte Patientenkollektiv lag bei 3,5 – 4 Jahren. Nur die Patienten ohne zusätzliche Risiken für eine Abstoßung oder Transplantatversagen wurden hier statistisch ausgewertet. Die Hochrisikopatienten wurden aus der statistischen Analyse ausgeschlossen, da in dieser Gruppe eine multifaktorielle Ursache für postoperativen Endothelverlust vorliegt. Eine genaue Differenzierung der Faktoren die für den Transplantatversagen oder die Abstoßung verantwortlich gemacht werden könnten, wurde in unserer Arbeit nicht versucht.

Die Parameter: Patientenalter, Patientengeschlecht, mittlere Nachbeobachtungszeit, Spenderalter, Spendergeschlecht, Post-mortem-Zeit, mittlere Kulturdauer, mittlere präoperative Endothelzellzahl, HLA-Mismatch zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Endotoxin-Konzentration in KM 1 und KM 2 .

Ein prozentualer Endothelzellverlust 3 Jahre nach perforierender Keratoplastik in der Normalrisiko-Gruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf den Patienten- und Spenderalter, Patienten- und Spendergeschlecht, Todesursache, Kulturdauer und HLA-Mismatch. Eine negative Auswirkung zeigte eine prolongierte post-mortem-Zeit, was Böhringer (2002) nachgewiesen hat. In seine Arbeit zeigte er, dass auch hoher Spenderalter und Kulturdauer ein Einfluss auf den chronischen Endothelzellverlust ohne statistische Signifikanz ist. Dies konnten wir in der univariaten Analyse nicht bestätigen. In unserer Arbeit lag das mittlere Spenderalter bei 60 Jahren, in der Arbeit von Böhringer bei 46,1 Jahren, die Kulturdauer war mit 17,2 und 17,5 Tagen vergleichbar. Auch Redbrake (1994) konnte kein Einfluss von Spenderalter auf die Endothelzellichte der Transplantate nachweisen. Außerdem stellte sie einen unterschiedlichen kornealen Metabolismus in den Organkulturmedien in Abhängigkeit von der Todesursache fest. Wir stellten keinen Unterschied im Endothelzellverlust in Abhängigkeit von der Todesursache 3 Jahre nach Keratoplastik fest. Insbesondere zu beachten ist, dass auch bei Sepsis als Todesursache (bei 21 transplantierten Hornhäuten), wo hypotetisch eine erhöhte bakterielle Belastung der Spenderhornhaut vorliegt, keinen zunehmenden Endothelzellverlust und erhöhte Inzidenz für die Immunreaktionen beobachtet wurde, was in der retrospektive Studie von Spelsberg (2004) gezeigt wurde.

Bei Untergruppenanalyse in KM 1 und KM 2 mit Endotoxin-Konzentration  $<1$  und  $\geq 1$  U/ml konnten wir in Bezug auf die oben beschriebene Parameter keinen signifikanten Unterschied feststellen. Damit nehmen wir an, dass die in dieser Studie untersuchten verschiedenen Endotoxin-Konzentrationen in den Organkulturmedien keinen Einfluss auf den postoperativen Endothelzellverlust haben.

Der langfristige Erhalt eines zentral klaren Transplantates ist Hauptziel nach jeder perforierenden Keratoplastik. Immunreaktionen gegen das Transplantatendothel, der idiopathische Endothelzellverlust und postoperative Augeninnendrucksteigerungen gehören zu den häufigsten Störfaktoren (Reinhard und Sundmacher 2000b).

Als häufigste Ursache für ein irreversibles Transplantatversagen wird in der Literatur eine Immunreaktion, dann folgt eine Augeninnendruckdekompensation, primäres

Transplantatversagen und als eine seltene Ursache eine Infektion (Ing 1998, Kückle 2002, de Freitas 2006 ).

In unserer Studie hatten 9 (10,11 %) von 89 Patienten eine Abstoßung 5 Jahre nach in der Normalrisiko-Keratoplastik. Diese Zahl liegt niedriger als die meisten in der Literatur aufgeführten Zahlen: Reinhard (1997) 18%, Kückle (2002) 13,5 %, Pleyer (2003) 5-30%, Wachtlin (2003) 30-40%. Bei Untergruppenanalyse in KM 1 und KM 2 stellten wir kein gehäuftes Auftreten einer Immunreaktion mit Endotoxin-Konzentration  $\Rightarrow$ 1 U/ml fest. Dies zeigt auch die Kaplan-Meier-Kurve.

Damit nehmen wir an, dass die in der Studie untersuchten verschiedenen Endotoxin-Konzentrationen in den Organkulturmedien keinen Einfluss auf den immunologischen Status der Hornhauttransplantate haben.

Zu bemerken ist hingegen ein fast doppelt so hoher prozentualer Endothelzellverlust 3 Jahre nach Keratoplastik bei Patienten mit Immunreaktion in Vergleich zu den Patienten ohne Immunreaktion (Musch 1993, Claerhout 2003)

Eine längere postoperative Druckdekompensation mit irreversiblen Transplantatversagen bei Patienten ohne präoperativ bekanntes Glaukom fand sich bei 3 Augen (3,3 %). In der Studie von Pramanik (2006) entwickelten 5,4 % der Patienten, in der Studie von Reinhard (2001) 6% der Patienten nach einer Normalrisiko-Keratoplastik und 10% der Patienten in einer gemischten Patientengruppe in der Arbeit von Redbrake (2004) ein chronisches Offenwinkelglaukom.

Bei einem Patienten (1,1%) trat ein Transplantatversagen aufgrund chronischer Oberflächenstörung auf.

Eine Endophthalmitis kann nach Keratoplastiken auftreten. Insgesamt ist die Endophthalmitis-Rate nach einer Hornhauttransplantation mit 0,2 % niedrig (Rehany 2004). In unserer Studie wurde postoperativ keine Endophthalmitis beobachtet.

Als Schlussfolgerung konnten wir zeigen, dass eine sehr niedrige Endotoxin-Konzentration in den mikrobiologisch sterilen Organkulturmedien unter den Standardbedingungen der Hornhautbank keinen Einfluss auf den postoperativen Endothelzellverlust und keinen fördernden Effekt auf Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik bei Normalrisikopatienten hat. Hier darf auch nicht vergessen werden, dass die experimentelle Endotoxin-Konzentrationen, die zu einem nachweisbarem Endothelzellverlust führt bei Konzentrationen von  $10^4$  U/ml liegt, eine Konzentration, die bei sterilen Medien gar nicht vorliegen kann.

## 5. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Endotoxine in Organkulturmedium die Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen stimulieren können, was zu einer Zerstörung der Endothelzellen von Hornhauttransplantaten führt. Es wurde angenommen, dass die Exposition von Hornhauttransplantaten mit Endotoxin bei Transplantatabstoßung und erhöhtem Endothelzellverlust nach perforierender Keratoplastik eine Rolle spielt. Das Ziel dieser prospektiven Studie war die Überprüfung dieser Hypothese. Patienten und Methoden: 410 Proben von sterilen Organkulturmedien wurden zwischen August 1998 und Februar 1999 von 312 menschlichen Hornhauttransplantaten konsekutiv gesammelt. Die Proben wurden mit Hilfe des Limulus Amöbozyten Lysat-Tests auf Endotoxin-Konzentration im Organkulturmedium 7 Tage nach Kultivierung und im Organkulturmedium 2 - zwischen 12 Stunden und maximal 4 Tage präoperativ, getestet. Der Grenzbereich des Endotoxin-Niveau wurde bei 1,0 U/ml festgelegt. Von den 312 Hornhäuten wurden 125 verworfen, 158 in eigenem Hause transplantiert (wobei 2 Patientinnen an beiden Augen transplantiert wurden), 2 aufgenäht und weitere 27 über Bio Implant Services Foundation (BIS), Leiden, Niederland, an andere Kliniken versandt. Von 158 Hornhäuten wurden 105 bei den Normalrisiko- und 53 bei den Hochrisiko-Patienten transplantiert. Nur Normalrisiko-Patienten wurden in dieser Studie 5 Jahre nach Keratoplastik statistisch ausgewertet. Es wurden Immunreaktionen, Endothelzellverlust und irreversibles Transplantatversagen aufgezeichnet. Ergebnisse: Der mittlere Endotoxin-Wert bei allen transplantierten Hornhäuten lag in der KM 1 bei  $1,52 \pm 2,45$  U/ml, in der KM 2 bei  $1,39 \pm 0,48$  U/ml. Der mittlere Endotoxin-Wert bei allen verworfenen Hornhäuten lag in der KM 1 bei  $2,15 \pm 5,6$  U/ml. Die Proben mit Endotoxin-Konzentration unter 1 U/ml wurden als Endotoxin-negative, mit  $\geq 1$  U/ml als Endotoxin-positive bezeichnet. In der Normalrisiko-Gruppe waren in der KM 1 55 Proben und in der KM 2 17 Proben Endotoxin-negativ, 34 Proben in der KM 1 und 40 Proben in der KM 2 waren Endotoxin-positiv. Wir stellten kein statistisch signifikanter Einfluss der Endotoxin-Konzentration auf die Inzidenz der Immunreaktion, den postoperativen Endothelzellverlust oder irreversibles Transplantatversagen fest. Schlussfolgerung: Eine niedrige Endotoxin-Konzentration in den mikrobiologisch sterilen Organkulturmedien unter den Standardbedingungen der Hornhautbank hat kein Einfluss auf die postoperativen Endothelzellverlust und keinen fördernden Effekt auf die Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik bei Normalrisikopatienten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Albert DM (1996). Corneal Surgery. In: Albert DM, Edwards DD (Hrsg.): The History of Ophthalmology. Blackwell Science, 1996; 225-33
2. Bang, FB (1953). The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Biol. Bull (Woods Hole, MA)* 1953; 105:361-362
3. Barnett MI, Cosslett AG (1998). Endotoxin-a clinical challenge. *British Journal of Intensive Care* 78-87
4. Bertelmann E, Reinhard T, Pleyer U (2003) Stand der Immunprophylaxe und -therapie bei perforierender Keratoplastik. *Ophthalmologe* 2003; 100:1031-1035
5. Bartels MC, Otten HG, van Gelderen BE, 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* 2001; 85(11):1341-6
6. Böhnke M (1991) Spendergewebe für die Keratoplastik. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1991; 214:407-411
7. Böhringer D, Reinhard T, Spelsberg H, Sundmacher R (2002). Influencing factors on chronic endothelial cell loss characterised in a homogeneous group of patients. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(1):35-8
8. Böhringer D, Reinhard T, Sundmacher R (2003). Systematic EDP-supported acquisition of follow-up data of keratoplasty patients--report on ten years' experience. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2003; 220(4):253-6
9. Böhringer D, Reinhard T, Duquesnoy RJ, Bohringer S, Enczmann J, Lange P, Claas F, Sundmacher R (2004). Beneficial effect of matching at the HLA-A and -B amino-acid triplet level on rejection-free clear graft survival in penetrating keratoplasty. *Transplantation* 2004; 77(3):417-21
10. Bohringer D, Spierings E, Enczmann J, Bohringer S, Sundmacher R, Goulmy E, Reinhard T (2006). Matching of the minor histocompatibility antigen HLA-A1/H-Y may improve prognosis in corneal transplantation. *Transplantation* 2006, 27; 82(8):1037-41

11. Bourne WM, Hodge DO, Nelson LR (1994). Corneal endothelium five years after transplantation. *Am J Ophthalmol* 1994; 118(2):185-96
12. Bundesärztekammer (2000). Richtlinien zum Führen einer Hornhautbank. *Dt Ärzteblatt*. Aug 2000; 97: A 2122-2124 (Heft 31-32)
13. Claerhout I, Beele H, De Bacquer D, Kestelyn P (2003). Factors influencing the decline in endothelial cell density after corneal allograft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(11):4747-52
14. de Freitas AM, Melo BC, Mendonca CN, Machado RP, Rocha FJ (2006). Causes and risk factors for graft failure in surgeries performed by physicians in fellowship training. *Cornea* 2006; 25(3):251-6
15. Donnelly JJ, Li W, Prendergast RA (1985). Induction of class II alloantigen expression on corneal endothelium in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:575-580
16. Elnor VM, Strieter RM, Pavilak MA, Elnor SG, Remick DG, Danforth JM, Kunkel SL (1991). Human corneal Interleukin-8. IL-1 and TNF-induced gene expression and secretion. *Am J Pathol* 1991; 139: 977-988
17. Engelmann K (2006). Transplantatreaktion nach perforierender Keratoplastik. Ursachen und Management. *Z.prakt. Augenheilkd* 2006; 27: 307-319
18. Gould DS, Auchincloss H Jr. (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999; 20, 77-82
19. Grabner G, Luger TA, Smolin G, Oppenheim JJ. (1982). Corneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 23: 757-763
20. Grisanti S (1998). Immune privilege of the eye. *Ophthalmologe* 1998; 95(2):124-35
21. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987
22. Harms H (1954) Augenoperationen unter dem binokularen Mikroskop. *Ber Dtsch Ophthalmol Ges* 1954; 58:119

23. Harms, H (1957). Erfahrungen mit der fortlaufenden Naht bei der Keratoplastik. Marhold, Halle (Saale)
24. Harper CL, Boulton ME, Marcyniuk B, Tullo AB, Ridgway AE (1998). Endothelial viability of organ-cultured corneas following penetrating keratoplasty. Eye 1998; 12 (Pt 5):834-8
25. Hill JC (1995). Immunosuppression in corneal transplantation. Eye 1995; 9: 247-53
26. Hill JC. (2002). High risk corneal grafting. Br J Ophthalmol 2002; 86(9):945
27. Hochstei, H.D. (1987). The LAL test versus the rabbit pyrogen test for endotoxin detection: Update 87. Pharm Technol 1987; 11(6):124-129
28. Howell, W. H. (1885). Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular; 43:4-5.
29. Hudde T, Heinz C, Steuhl KP (2003). Gewebetransplantation-Hornhaut. [www.uni.essen/de/augenklinik/if/hornhaut.html](http://www.uni.essen/de/augenklinik/if/hornhaut.html)
30. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM (1998). Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. Ophthalmology 1998; 105(10):1855-65
31. Airedin R, Wachtlin J, Hopfenmuller W, Hoffmann F (2003). HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2003; 241(12):1020-8
32. Khodadoust AA, Silverstein AM (1969). Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1969; 8:180-195
33. Khodadoust AA, Silverstein AM (1976). Induction of corneal graft rejection by passive cell transfer. Invest Ophthalmol 1976; 15 (2):89-95
34. Krensky A, Weiss A, Crabtree G, Davis M, Parham P (1990). T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. N Engl J Med 1990; 322: 510-517
35. Krensky AM (1997). The HLA-System, antigen-processing and presentation. Kidney Int 1997; 51; Suppl 58:S2-7
36. Kuchle M, Cursiefen C, Nguyen NX, Langenbacher A, Seitz B, Wenkel H, Martus P, Naumann GO (2002). Risk factors for corneal allograft rejection:

- intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240(7):580-4
37. Langenbucher A, Nguyen NX, Kus MM, Bluthner K, Kuchle M, Seitz B (2000). Regression analysis of corneal endothelium after nonmechanical penetrating keratoplasty. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2000; 216(6):393-9
  38. Levin J, Bang FB (1964a). A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp* 1964; 115:337-345
  39. Levin J, Bang FB (1964b). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp* 1964; 115:265-274
  40. Levin, J, Bang FB (1968). Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh* 1968; 19:186-197
  41. Lund OE.(1985) Die Hornhautübertragung. In: Dietrich, E. (Hrsg.): *Organspende, Organtransplantation*. Schulz-Verlag, Percha. 1985; S.38
  42. Mannis MJ, Krachmer JH. (1981). Keratoplasty: a historical perspective. *Surv Ophthalmol* 1981; 25:333-338
  43. Maumane AE (1951). The influence of donor-recipient sensitization on corneal grafts. *American J Ophthalmol* 1951; 11: 146-154
  44. Mayer K, Reinhard T, Reis A, Voiculescu A, Sundmacher R (2003). Synergistic antiherpetic effect of acyclovir and mycophenolate mofetil following keratoplasty in patients with herpetic eye disease: first results of a randomised pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241(12):1051-4
  45. McCarey BE, Kaufmann HE (1974). Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974; 13:165-73
  46. Milne, Edwards, H. (1873). *Historie naturelle des Crustacea.*, Paris, 1873 ; 1834-40
  47. Musch DC, Schwartz AE, Fitzgerald-Shelton K, Sugar A, Meyer RF (1991) The effect of allograft rejection after penetrating keratoplasty on central endothelial cell density. *Am J Ophthalmol* 1991; 111(6):739-42
  48. Musch DC, Meyer RF, Sugar A (1993). Predictive factors for endothelial cell loss after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 1993; 111(1):80-3

49. Mürer EH, Levin J, Holm R (1975). Isolation and studies of the granules of the ameobocytes of *Limulus polyphemus*, the horseshoe crab. *J. Cell Physiol* 1975; 86: 533-542
50. Nguyen NX, Seitz B, Langenbacher A, Graupner M, Kus MM, Bluthner K, Kuchle M, Naumann GO (1999). Transplant endothelium and measuring corneal thickness after non-high-risk keratoplasty with briefly or long-term preserved corneal donor tissue. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1999; 215(3):169-74
51. Niederkorn JY, Shaddock JA, Streilein JW (1981) Immunogenetic basis for immunologic privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunogenetics* 1981; 13:227–236
52. Niederkorn JY (2001) Mechanisms of corneal graft rejection: the sixth annual Thygeson Lecture, presented at the Ocular Microbiology and Immunology Group meeting, *Cornea* 2001; 20:675–679
53. Niederkorn JY (2003). The immune privilege of corneal grafts. *J Leukoc Biol* 2003; 74(2):167-71
54. Nishimura JK, Hodge DO, Bourne WM (1999). Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology* 1999; 106(10):1962-5
55. Novitsky, T. J. (1984). Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. *Oceanus* 1984; 27:13-18
56. Paufigue L, Sourdille GP, Offret G (1948) Les greffes de la cornée. La maladie du greffon. Maison et Cie (eds), Paris, France 1948; 131–136
57. Pleyer U (1997) Immunreaktion nach perforierender Keratoplastik. *Immunbiologie und Therapie. Ophthalmologe* 1997; 94: 933-950
58. Pleyer U. (2003) Immunmodulation bei perforierender Keratoplastik – Stand und Perspektiven. *Ophthalmologe* 2003; 100(12):1036-44
59. Power H (1873). On transplantation of the cornea. *Rep Internat Ophth Cong*, London 1873; 4:172-176

60. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA (2006). Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology* 2006; 113(9):1633-8
61. Quigley JP, Corcoran G, Armstrong PB (1997). A Hemolytic Activity Secreted by the Endotoxin-Challenged Horseshoe Crab: A Novel Immune System Operating at the Surface of the Carapace, *Biological Bulletin* 1997; 193: 273
62. Redbrake C, Arend O (2000). Corneal transplantation and glaucoma. *Ophthalmologie* 2000; 7(8):552-6
63. Reinhard T, Sundmacher R (1992). Perforating keratoplasty in endogenous eczema. An indication for systemic cyclosporin A--a retrospective study of 18 patients *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1992; 201(3):159-63
64. Reinhard T, Sundmacher R (1997a). Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik mit normalem Immunrisiko. *Transplantationsmedizin* 1997; 9:203–207
65. Reinhard T, Hutmacher M, Sundmacher R, Godehardt E (1997b). Akute und chronische Immunreaktionen nach perforierender Keratoplastik mit normalem Immunrisiko. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997; 210:139–143
66. Reinhard T, Sundmacher R, Godehard E, Heering P (1997c). Systemische Cyclosporin-A-Prophylaxe nach Keratoplastiken mit erhöhtem Risiko für Immunreaktionen als einzigem erhöhtem Risikofaktor. *Ophthalmologie* 1997; 94: 496-500
67. Reinhard T, Sundmacher R (1998). Die Bedeutung von Immuntherapie und HLA-Matching für die Langzeitprognose perforierender Hornhauttransplantate. *Transplantationsmed* 1998; 10:94-96
68. Reinhard T, Möller M, Sundmacher R (1999). Penetrating keratoplasty in endogenous ekzema with and without systemic cyclosporin A. *Cornea* 1999; 18:645-651
69. Reinhard T, Reis A, Bohringer D et al. (2001a). Systemic mycophenolate mofetil in comparison with systemic cyclosporin A in high-risk keratoplasty patients: 3 years<sup>†</sup> results of a randomized prospective clinical trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239:367–372

70. Reinhard T, Bonig H, Mayweg S, Bohringer D, Gobel U, Sundmacher R.(2002a). Soluble Fas ligand and transforming growth factor beta2 in the aqueous humor of patients with endothelial immune reactions after penetrating keratoplasty. Arch Ophthalmol 2002; 120(12):1630-5
71. Reinhard T, Bohringer D, Sundmacher R. (2001b). Accelerated chronic endothelial cell loss after penetrating keratoplasty in glaucoma eyes. J Glaucoma 2001; 10(6):446-51
72. Reinhard T, Bohringer D, Huschen D, Sundmacher R. (2002b). Chronischer Endothelzellverlust des Transplantates nach perforierender Keratoplastik: Einfluss der Migration von Endothelzellen vom Transplantat zur Wirtshornhaut. Klin Monatsbl Augenheilkd 2002; 219(6):410-6
73. Reinhard T, Bohringer D, Enczmann J et al. (2003) HLA class I and II matching improves prognosis in penetrating normal-risk keratoplasty. Dev Ophthalmol 2003; 36:42–49
74. Reinhard T, Bohringer D, Enczmann J, Kogler G, Wernet P, Bohringer S, Sundmacher R (2004). HLA class I/II matching and chronic endothelial cell loss in penetrating normal risk keratoplasty. Acta Ophthalmol Scand 2004; 82(1):13-8
75. Reinhard T, Mayweg S, Sokolovska Y, Seitz B, Mittelviehhaus H, Engelmann K, Voiculescu A, Godehardt E, Sundmacher R (2005). Systemic mycophenolate mofetil avoids immune reactions in penetrating high-risk keratoplasty: preliminary results of an ongoing prospectively randomized multicentre study. Transpl Int 2005 Jun;18(6):703-8
76. Reis A, Reinhard T, Voiculescu A et al. (1999). Effect of mycophenolate mofetil versus Cyclosporin A in high-risk keratoplasty patients: a prospective clinical trial. Br J Ophthalmol 1999; 83:1268–1271
77. Reis A, Reinhard T, Voiculescu A (2001). Hochaktive antivirale und immunsuppressive Kombinationstherapie mit Acyclovir und Mycophenolatmofetil nach Keratoplastik bei herpetischer Grunderkrankung. Klin Monatsbl Augenheilkd 2001; 218: 183-186

78. Rehany U, Balut G, Lefler E, Rumelt S. (2004). The prevalence and risk factors for donor corneal button contamination and its association with ocular infection after transplantation. *Cornea* 2004; 23(7):649-54
79. Remky H, Locher W (1997). Zur Geschichte der Keratoplastik, Rückblick auf Keratoprothesen-Implantation und Hornhauttransplantation 1789-1900. Vortrag bei XI. Zusammenkunft der Julius-Hirschberg-Gesellschaft 16.-18. Oktober 1997 , Leiden
80. Rohrbach JM, Tost F (2004) Geschichte der Keratoplastik. Vortrag bei der 88. Tagung der Württembergischen Augenärztlichen Vereinigung in Tübingen
81. Sakamoto S, Inada K (1992) Human corneal epithelial, stromal and endothelial cells produce interleukin-6. *Nippon-Ganka-Gakkai- Zasshi* 1992; 96: 702-709
82. Seitz B, Langenbacher A, Diamantis A, Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO (2001). Immunological graft reactions after penetrating keratoplasty - A prospective randomized trial comparing corneal excimer laser and motor trephination. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001; 218(11):710-9
83. Segukuchi, Koichi, (1988). "Hemocytes and Coagulogen, A coagulation factor," *Biology of Horseshoe Crabs* 1988; 334, 338
84. Sellarbeck (1878). Über Keratoplastik. *Albrecht von Graefes Arch für Ophthalmol* 1878; 4:1-46
85. Sobottka Ventura AC, Pels E, Engelmann K, Richard G, Bohnke M (1996). Detection of endotoxin in media from sterile corneal organ cultures. *Ger J Ophthalmol* 1996; 5(6):404-7
86. Sobottka Ventura AC, Rodokanak, von Schrenk A, Hollstein K, Hagenah M, Bohnke M, Engelmann K (1997). Endothelial cell death in organ-cultured donor corneae: the influence of traumatic versus nontraumatic cause of death. *Ophthalmologie* 1998; 95(11):755-9
87. Sobottka Ventura A, Engelmann K, Dahinden C, Böhnke M (1998). Einfluss von E. coli- Endotoxin auf die auto-/parakrine Funktion und den Endothellverlust von Spenderhornhäuten in der Organkultur. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235(4):230-3

88. Sobottka Ventura AC, Engelmann K, Bohnke M (1999). Fetal calf serum protects cultured porcine corneal endothelial cells from endotoxin-mediated cell damage. *Ophthalmic Res* 1999; 31(6):416-25
89. Sobottka Ventura AC, Bohnke M (1999). Bacterial lipopolysaccharides in sterile corneal organ-culture media. *Cornea* 1999; 18(1):92-7
90. Spelsberg H, Reinhard T, Sokolovska Y, Zysk G, Bohringer D, Sundmacher R (2004). Endotoxin in storage medium of human corneal grafts and clinical course after penetrating normal-risk keratoplasty. *Eye* 2004; 18(9):923-8
91. Streilein JW (1997). Molecular basis of ACAID. *Ocul Immunol Inflamm* 1997; 5(3):217-8
92. Sundmacher R (1977). Immunreaktionen nach Keratoplastik. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1977; 171:705–722
93. Sundmacher R, Stefansson A, Mackensen G (1983). Postoperative course after keratoplasty. *Fortschr Ophthalmol* 1983; 80(3):224-7
94. Sundmacher R, Reinhard T, Heering P (1992). 6 years experience with systemic Cyclosporin A prophylaxis in high risk perforating keratoplasty. *German J Ophthalmol* 1992; 1:432-436
95. Sundmacher R, Reinhard T (1994). Cyclosporin A in high risk perforating keratoplasty. In: Zierhut M, Pleyer U, Thiel HJ (Eds, *Immunology of corneal transplantation*. Aeolus Press, Amsterdam 1994; pp. 233-238
96. Sundmacher R, Reinhard T (2001). Bedarfsdeckung mit qualitäts-gesicherten Hornhauttransplantaten. Die Rolle der Hornhautbanken und der Kostenträger in Deutschland. *Ophthalmologie* 2001; 98:277-284
97. Sykes M. (1996). Immunobiology of transplantation. *FASEB J* 1996;10:721-730
98. Thompson RW Jr, Price MO, Bowers PJ, Price FW Jr (2003). Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2003; 110(7):1396-402.
99. Vail A, Gore SM, Bradley BA (1994). Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. *Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators*. *Ophthalmology* 1994; 101:120–127

100. Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA, Armitage WJ (1996). Clinical and surgical factors influencing corneal graft survival, visual acuity and astigmatism. *Ophthalmology* 1996; 103:41-49
101. Volker-Dieben HJ, Claas FH, Schreuder GM et al. (2000). Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal allografts. *Transplantation* 2000; 70:640–648
102. Waldock A, Cook SD. (2000). Corneal transplantation: how successful are we? *Br J Ophthalmol* 2000; 84(8):813-5
103. Wachtlin J, R. Khaireddin und F. Hoffmann (2003). Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik. *Ophthalmologe* 2003; 100: 1021-1030
104. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc. (1987). Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. *Progress in Clinical and Biological Research* Vol. 231, NY.
105. Zierhut M, Wohlrab TM (1997). *Dt Ärzteblatt* 1997; 94: A-1429-1433
106. Zirm, E. (1906). Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Albrecht von Graefes Arch. für Ophthalmol.* 1906; 64:580-593.
107. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF (1985) Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985; 4:671-678
108. Young E, Stark WJ, Prendergast RA (1985). Immunology of corneal allograft rejection: HLA-DR antigens on human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26 571-574

## **7. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Reinhard für die Annahme als Doktorandin und ebenso für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Jousen für ihre tatkräftige, nette und konstruktive Unterstützung und meiner Betreuerin und akademischen Lehrerin Frau Dr. Spelsberg.

Ferner danke ich Herrn Dr. Zysk und den Mitarbeitern der Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf für ihre Unterstützung.

Ich danke Frau Rosenbaum und Frau Mix, die mir in allen inhaltlichen und formellen Fragen jederzeit zur Seite standen.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche

#### Daten:

**Name:** Sokolovs'ka, Yevgeniya

**Wohnort:** Himmelgeisterstr. 153  
40225 Düsseldorf  
Tel.0211-9346706

**Geburtsdatum:** 04.01.74

**Geburtsort:** Wladiwostok, Russland

**Familienstand:** verheiratet

#### Schulbildung:

1981- 1991 Mittelschule in Simferopol, Ukraine  
Abschluss: Reifezeugnis (1,0)

#### Studium:

09/1991-07/1995 8 Semester Medizinstudium  
an der Staatlichen Medizinischen Hochschule, Krim/Ukraine

08/1995-08/1996 Au-Pair in Bonn, ABC-Sprachschule  
10/1996 bestandene Prüfung zum Nachweis deutsche Sprachkenntnisse  
04/1997-10/2000 Studium der Humanmedizin ab dem 3. klinischen Semester an der  
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf  
Ärztliche Vorprüfung und Erster Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung anerkannt gemäß § 12 ÄAppO im Sinne der  
Approbationsordnung für Ärzte.

09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2000-09/2001 Praktisches Jahr an dem Universitätsklinikum Düsseldorf  
Wahlfach Augenheilkunde ( Prof. Dr. med. R. Sundmacher)  
28.11.2001 Ärztliche Prüfung mit der Note - gut - abgelegt

#### Famulaturen:

08/1997-09/1997 Gynäkologie und Geburtshilfe / Zentrum zum Schutz der  
Mutterschaft und Kindheit, Simferopol

02/1999-03/1999 Augenheilkunde/ Augenklinik, Universität Düsseldorf  
03/1999-04/1999 Urologie/ urologische Universitäts-Klinik, Düsseldorf

08/1999 Augenheilkunde/ Klinisches Krankenhaus, Simferopol  
09/1999 Allgemeinmedizin/ Praxis M.D.R. Dakik, Hamminkeln

#### Promotion:

Seit 09/1999 Unter der Leitung von Prof. Dr. T. Reinhard, Fr. Dr. H. Spelsberg  
Augenklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

#### Arbeitsstellen:

01/02-07/03 ÄiP an der Uni-Augenklinik Düsseldorf  
07/03- bis dato Assistenzärztin an der Uni-Augenklinik Düsseldorf