

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von mechanischem Stress auf die Endothelzellichte der menschlichen
Hornhaut

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Pia Peche
aus Wedel

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

11. Oktober 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Die Hornhaut als Teil des dioptrischen Apparates	1
1.2 Die Hornhautspende	6
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	7
2 Literaturdiskussion.....	9
2.1 Literaturrecherche in PubMed.....	9
2.2 Oxidativer Stress.....	10
2.2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen	10
2.2.2 Schutzmechanismen gegen reaktive Sauerstoffverbindungen.....	15
2.3 Mechanisches Trauma.....	19
2.3.1 Einfluss von extra- und intraokulärer Kraft auf die Endothelzelldichte intakter Bulbi	20
2.3.2 Einfluss von Kraft auf die Endothelzelldichte organkultivierter Hornhäute.....	24
2.4 Zusammenfassung.....	27
3 Material und Methoden.....	30
3.1 Untersuchungsmodell menschliches Hornhauttransplantat	30
3.2 Versuchsdurchführung.....	31
3.2.1 Versuchsreihe I.....	32
3.2.2 Versuchsreihe II.....	36
3.2.3 Ermittlung der Endothelzelldichte.....	38
3.2.4 Versuchsreihe III - DHE-Färbung.....	39
3.3 Statistische Auswertung der erhobenen Daten	40
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Zusammensetzung des Kollektivs untersuchter Hornhäute	42
4.2 Höhe der physikalischen Parameter während des Fallversuchs.....	44
4.3 Folgen des mechanischen Einflusses auf die Endothelzelldichte	45

4.4	Einfluss der Nebenkriterien auf die initiale Endothelzell-dichte und den prozentualen Endothelzellverlust	50
4.5	Ergebnisse der Endothelzell-dichte-Bestimmung bis zum Messende ..	52
4.6	Ergebnisse der DHE-Färbung	58
5	Diskussion	59
5.1	Diskussion der Methodik	59
5.1.1	Untersuchungsmodell menschliches Hornhauttransplantat ...	59
5.1.2	Versuchsdurchführung	60
5.2	Diskussion der Ergebnisse	64
5.2.1	Fallkräfte	64
5.2.2	Oxidativer Stress	66
5.2.3	Korrelationen der Nebenkriterien mit der initialen Endothelzell-dichte und dem Endothelzellverlust	69
5.3	Schlussfolgerungen	72
6	Zusammenfassung	76
7	Literaturverzeichnis	78
8	Anhang	84
9	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

AE2	Anionen-Austauscher 2
AK	Abbruchkriterium
AMD	Altersbedingte Makula-Degeneration
AQP1	Aquaporin 1
AT ₁	Angiotensin 1
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSS	Lösung mit gepuffertem pH-Wert und isotoner Salzkonzentration (<u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution)
CAT	Katalase
CEC	Hornhautendothelzelle(n) (<u>c</u> orneal <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell(s))
CFTR-Kanal	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid)
ECD	Endothelzelldichte (<u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>d</u> ensity)
ECL	Endothelzellverlust (<u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>l</u> oss)
GSH	reduzierte Form von Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
HE	Hydroethidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
I	Intervention
K	Kontrolle
Kir2.1 / KCNQ1	spezieller Kalium-Kanal
M1	Kulturmedium I (culture medium I) = Lagerungsmedium
M2	Kulturmedium II (culture medium II) = Transportmedium
MCT1/2	Monocarboxylat-Transporter 1/2

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBCe1A	spezieller Natrium-Bikarbonat-Symporter
NBCe1B	spezieller Natrium-Bikarbonat-Symporter
NKCC1	Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter 1
NOX	NADP(H)-Oxidase
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen (<u>r</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies)
SLC	spezieller Natrium-Wasserstoff-Antiporter
SOD	Superoxid-Dismutase
UV	Ultraviolett(e) (im Zusammenhang mit Strahlung)

Verwendete physikalische Einheiten und Bezeichnungen

°C	Grad Celsius (Einheit für Temperatur)
a	Beschleunigung
A	Fläche
CEC/mm ²	Hornhautendothelzellen pro mm ²
cm	Zentimeter (Einheit für Strecke)
η	Viskosität
F _G /F	Gravitationskraft/Kraft
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm (Einheit für Gewicht)
h	Höhe
Hz	Hertz (Einheit für Frequenz)

kg	Kilogramm (Einheit für Gewicht)
kg/m ³	Kilogramm pro Kubikmeter (Einheit für Dichte)
kHz	Kilohertz (Einheit für Frequenz)
kPa	Kilopascal (Einheit für Druck)
l	Liter (Einheit für Volumen)
m	Meter (Einheit für Strecke)
<i>m</i>	Masse in Kilogramm
m ³	Kubikmeter (Einheit für Volumen)
min	Minute(n) (Einheit für Zeit)
ml	Milliliter (Einheit für Volumen)
mm	Millimeter (Einheit für Strecke)
mm ²	Quadratmillimeter (Einheit für Fläche)
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Einheit für Druck)
mN	Millinewton (Einheit für Kraft)
mPa·s	Millipascalsekunde (Einheit für Viskosität)
N	Newton (Einheit für Kraft)
nm	Nanometer (Einheit für Strecke)
<i>p</i>	Druck
Pa	Pascal (Einheit für Druck)
r	Radius
s	Bremsweg
sec/s	Sekunde(n) (Einheit für Zeit)
t	Dauer des Fallversuchs
v	Geschwindigkeit
µm	Mikrometer (Einheit für Strecke)

Verwendete chemische Formeln

Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cu^+	Kupfer
e^-	Elektron
Fe^{2+}	Eisen
H^+	Wasserstoff
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCO_3^-	Bikarbonat
K^+	Kalium
Na^+	Natrium
O^-	Oxyl-
O_2^{2-}	Peroxid-Anion
O^{2-}	Oxid-Anion
O_2	Sauerstoff
O_2^-	Superoxid-Anion
$\text{OH}\cdot$	Hydroxyl-Radikal

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anatomie des Auges.....	2
Abb. 2:	Anatomie der Hornhaut.....	3
Abb. 3:	Ionenkanäle und Transporter der Hornhautendothelzelle.....	4
Abb. 4:	Endothelzellmikroskopie von normalem und verändertem Hornhautendothel.....	5
Abb. 5:	Anzahl der in PubMed aufgeführten Veröffentlichungen.....	9
Abb. 6:	Sclerocorneal-Ring.....	30
Abb. 7:	Transfer eines Sclerocorneal-Rings.....	33
Abb. 8:	Inverses Lichtmikroskop Typ Nikon TE2000S.....	34
Abb. 9:	Hornhäute desselben Spenders im Glasgefäß ohne und nach Intervention.....	37
Abb. 10:	Manuell ausgezählte mikroskopische Aufnahme des Hornhautendothels.....	38
Abb. 11:	Absolute initiale Endothelzelldichte untersuchter Hornhäute.....	43
Abb. 12:	Differenzen des mittleren relativen ECL zwischen Interventions- und Kontrollgruppe in Versuchsreihe I.....	46
Abb. 13:	Differenzen des mittleren relativen ECL zwischen Interventions- und Kontrollgruppe in Versuchsreihe II.....	48
Abb. 14:	Vergleich des Endothelzellverlustes der Interventionsgruppe mit dem der Kontrollgruppe zum Messzeitpunkt Tag 21 aller untersuchten Hornhäute.....	49
Abb. 15:	Prozentualer Endothelzellverlust von Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe in Versuchsreihe I zum Zeitpunkt des Erreichens des Abbruchkriteriums.....	53
Abb. 16:	Prozentualer Endothelzellverlust von Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe in Versuchsreihe II zum Zeitpunkt des Erreichens des Abbruchkriteriums.....	54
Abb. 17:	Verlauf der absoluten Endothelzelldichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe I.....	55
Abb. 18:	Verlauf der absoluten Endothelzelldichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe II.....	56
Abb. 19:	Relative Intensität der DHE-Fluoreszenz.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entstehung eines Superoxid-Anions.....	11
Tabelle 2: Entstehung von ROS aus einem oder mehrerer Superoxid-Anionen	12
Tabelle 3: Katalysierte Reaktion der NADPH-Oxidase.....	14
Tabelle 4: Katalysierte Reaktionen der Xanthinoxidoreduktase	15
Tabelle 5: Katalysierte Reaktionen der Superoxid-Dismutase und der Katalase.....	17
Tabelle 6: Katalysierte Reaktion der Glutathion-Peroxidase	17
Tabelle 7: Übersicht der Versuchsreihen I und II	32
Tabelle 8: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe I bis zum Messzeitpunkt Tag 21	45
Tabelle 9: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe I bei Ausschluss des Hornhautpaares geringster Messdauer.....	47
Tabelle 10: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe II bis zum Messzeitpunkt Tag 21	47
Tabelle 11: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe II bei Ausschluss des Hornhautpaares geringster Messdauer.....	49
Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten von initialer Endothelzelldichte verglichen mit den Nebenkriterien	51
Tabelle 13: Korrelationskoeffizienten von Endothelzellverlust in Prozent zum Messzeitpunkt Tag 21 verglichen mit den Nebenkriterien	52
Tabelle 14: Darstellung der Anzahl und der Zuordnung zur Interventions- und Kontrollgruppe der das Abbruchkriterium erreichenden Hornhäute.....	54
Tabelle 15: Kontraindikationen von Hornhautspenden.....	84
Tabelle 16: Zusammensetzung der Kulturmedien M1 und M2	85

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Die Hornhaut als Teil des dioptrischen Apparates

Das menschliche Auge bildet als sogenannter optischer Apparat zusammen mit Augenlidern, Tränenapparat, Augenmuskeln und Bindehaut ein komplexes Sinnessystem, welches als Sehorgan bezeichnet wird (1, 2). Dieses ermöglicht es, Lichtreize in Form von elektromagnetischer Strahlung mit Wellenlängen zwischen 350 nm und 750 nm (2) wahrzunehmen. Die Sinneszellen des Auges, die als Photorezeptoren bezeichnet werden, generieren hieraus elektrische Impulse, die über den Sehnerv (Nervus opticus) zum Gehirn gelangen und dort in Form von Hell- und Dunkel-, bzw. Farbwahrnehmung verarbeitet werden. Während der Augapfel (Bulbus oculi) dem lichtbrechenden, dioptrischen Teil des Sehorgans zugeordnet wird, gehören die Photorezeptoren dem informationsverarbeitenden, dem sensorischen Teil an (1). Ersterer dient der Erzeugung eines reellen, spiegelverkehrten Bildes auf der Netzhaut (Retina), was durch Anpassung der Nah- und Ferneinstellung (Akkommodation) und Anpassung des Lichteinfalls durch die Pupillenöffnung (Adaption) unterstützt wird (2).

Die Wand des Bulbus oculi ist aus der Inneren Augenhaut (Tunica interna bulbi, bzw. Retina), der Mittleren Augenhaut (Tunica vasculosa bulbi, bzw. Uvea) und der Äußeren Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) aufgebaut (1). Während letztere vor allem die Lederhaut (Sclera) bildet und nur am vorderen Augenabschnitt in Bindehaut (Conjunctiva) und Hornhaut (Cornea) übergeht, bildet die Uvea, die am stärksten durchblutete Region des Körpers (3) bestehend aus Ziliarkörper (Corpus ciliare), Regenbogenhaut (Iris) und Aderhaut (Choroidea) (1).

Die Iris schützt die Photorezeptoren vor übermäßigem Lichteinfall, indem sie die Weite der Pupille variiert (Adaption). Sie mündet in den Ziliarkörper, der für die Akkommodation der direkt hinter der Pupille befindlichen Linse verantwortlich ist (3).

Eine Übersicht über den Aufbau des Auges liefert Abb. 1.

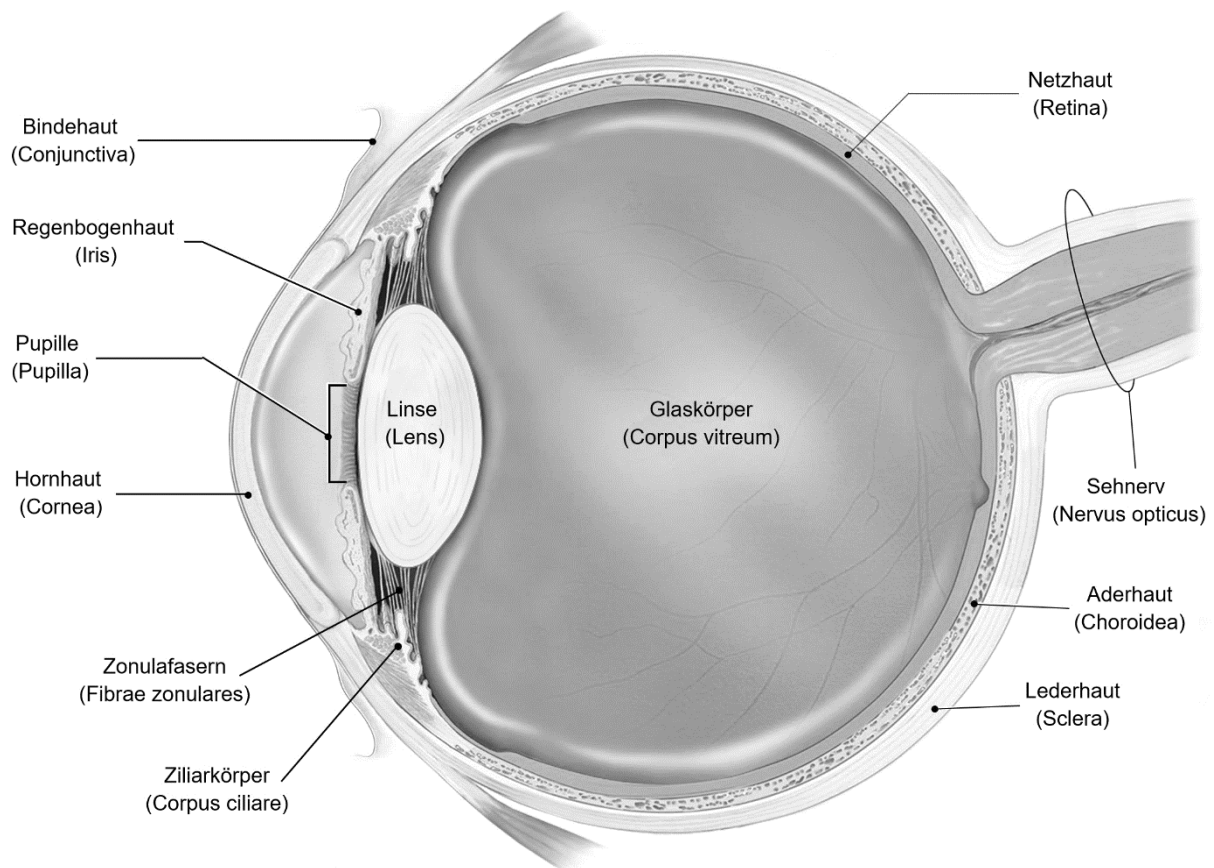


Abb. 1: Anatomie des Auges (Quelle: National Eye Institut (NIH), Flickr, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0-de, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode>, modifiziert).

Im vorderen Augenabschnitt befindet sich das von Schünke, Schulte et al. bezeichnete „Fenster des Auges“ (3), welches vom vorderen Abschnitt der Tunica fibrosa bulbi, der Cornea, gebildet wird. Diese übt zum einen eine Schutzfunktion des Auges gegenüber exogenen Einflüssen aus, zum anderen ist sie für den Seheindruck von großer Bedeutung (4).

Als Teil des dioptrischen Apparates spielt die Hornhaut eine entscheidende Rolle, da sie für etwa drei Viertel der optischen Brechkraft verantwortlich ist und mit 43 dpt den höchsten Anteil der Gesamtbrechkraft des menschlichen Auges einnimmt. Ihr Brechwert steht im direkten Zusammenhang mit dem Krümmungsradius und wird sowohl durch ein pump- und funktionsfähiges Endothel und Epithel als auch durch den Augeninnendruck aufrechterhalten. Durch ihre Gefäßfreiheit erscheint die Hornhaut transparent, sodass Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte über den Tränenfilm, das Kammerwasser der Vorderkammer und mittels Diffusion aus dem perilimbalen Randschlingennetz zu- und abtransportiert werden müssen. Durch die hohe sensible Innervation aus dem ersten Ast des Nervus trigeminus ist die

Hornhaut sehr schmerzsensibel und stellt das am stärksten innervierte Gewebe des menschlichen Körpers dar (4).

Ihr Durchmesser beträgt vertikal 10,55 bis 11,5 mm und horizontal 11,75 bis 12 mm, wohingegen ihre zentrale Dicke circa 520 bis 540 μm misst (4, 5). Diese ist jedoch interindividuell unterschiedlich und verringert sich mit Zunahme der Entfernung vom Zentrum (4).

Die Hornhaut besteht aus mehreren Schichten, welche in Abb. 2 dargestellt sind.

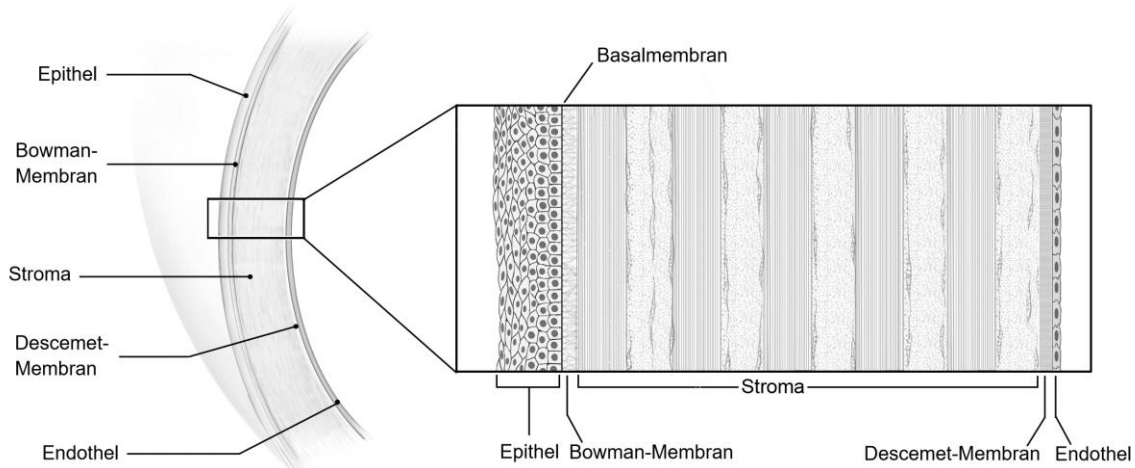


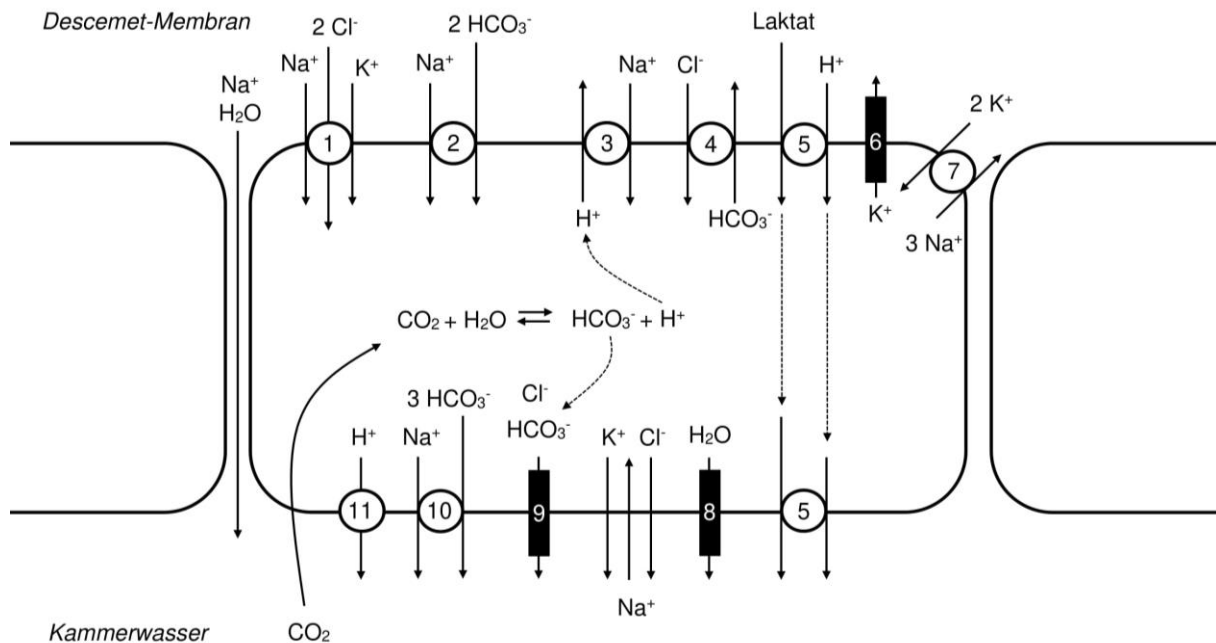
Abb. 2: Anatomie der Hornhaut (Quelle: National Eye Institut (NIH), Flickr, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0-de, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode>, modifiziert).

Für die Aufrechterhaltung der Hydrierung und Transparenz der Hornhaut ist vor allem die innerste Schicht, die Endothelzellschicht, verantwortlich (6). Diese entspringt im zweiten Embryonalmonat der Neuralleiste (Mesenchym) und besteht aus einem einreihigen, einschichtigen Endothel flacher kuboider Zellen, welche die innere Hornhautbegrenzung darstellen und überschüssige Flüssigkeit indirekt aus dem Stroma herauspumpen. Dies erfolgt durch spezielle Transporter, Kanäle und Adenosintriphosphatasen (ATPasen), wie dem NKCC1-Cotransporter, dem CFTR-Kanal oder der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (5, 7), welche einen osmotischen Gradienten erzeugen, dem die Flüssigkeit aus dem Stroma hinaus folgt (7).

Während hydrophile Glykosaminoglykane des Stromas Flüssigkeit osmotisch in das Innere der Hornhaut ziehen, sorgen vor allem die ATPasen für den aktiven Abtransport osmotisch wirksamer Substanzen aus dem Stroma hinaus. Dieses dynamische Gleichgewicht, das für die Aufrechterhaltung der Entgiftung der Hornhaut erforderlich

ist, wird als „Pump-Leak-Hypothese“ bezeichnet und ist eine Voraussetzung für die Transparenz der Hornhaut (8).

Einen Überblick über die Ionenkanäle und Transporter der Hornhautendothelzelle liefert Abb. 3.



1. Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter 1 (NKCC1)
2. spezieller Natrium-Bikarbonat-Symporter (NBCe1B)
3. spezieller Natrium-Wasserstoff-Antiporter (SLC)
4. Anionen-Austauscher 2 (AE2)
5. Monocarboxylat-Transporter 1/2 (MCT1/2)
6. spezieller Kalium-Kanal (Kir2.1 / KCNQ1)
7. Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺-K⁺-ATPase)
8. Aquaporin 1 (AQP1)
9. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal (CFTR-Kanal)
10. spezieller Natrium-Bikarbonat-Symporter (NBCe1A)
11. Wasserstoff-ATPase

Abb. 3: Ionenkanäle und Transporter der Hornhautendothelzelle (Quelle: Eigene Darstellung, in Anlehnung an Laurence Sullivan, Direktor der Australian Society of Ophthalmologists (9), Adjianto und Philp (10), Nehrke (11) und Patel und Parker (12).).

Durch die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts sorgt die Endothelzellschicht für eine suffiziente Entquellung der Hornhaut. Mit einem physiologischen Abfall von 0,6 Prozent jährlich nimmt diese Funktion jedoch stetig ab, sodass es bei Zelldichten unter 500 Zellen/mm² zu Hornhautödemen kommt (4, 8). Der Grund hierfür liegt in der

fehlenden Regenerationsfähigkeit der Endothelzellen, sodass Defekte nur durch Zellmigration und Zellfusion geschlossen werden können (13).

Dadurch kommt es zum Verlust der physiologischen sechseckigen Form der Zellen (siehe Abb. 4, Seite 5), was ebenfalls mit einem Funktionsverlust assoziiert ist (4).

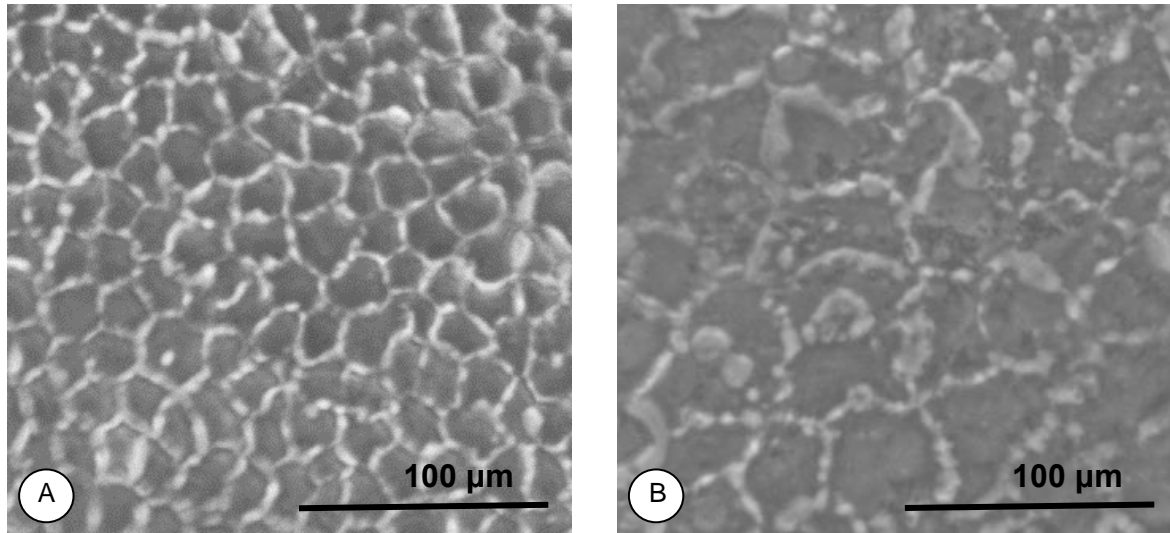


Abb. 4: Endothelzellmikroskopie von normalem und verändertem Hornhautendothel. (A) Normales Hornhautendothel mit physiologischer sechseckiger Form der Endothelzellen. (B) Verändertes Hornhautendothel mit Verlust der physiologischen sechseckigen Form der Endothelzellen durch Fusion. Weiter zeigt sich eine zunehmende Auflösung der Zellgrenzen.

Insgesamt zählt die menschliche Hornhaut zu den bradytrophen Geweben. Eine Regeneration erfolgt generell nur sehr langsam, da die Zellen des Endothels in der G1 Phase des Zellzyklus verharren (14).

Kommt es aufgrund unterschiedlicher Ursachen zu einer starken Schädigung des Hornhautgewebes, ist aufgrund dessen meist ein kurativer operativer Hornhauteingriff unumgänglich. Zu den kurativen operativen Hornhauteingriffen zählen die optische, die tektonische, die therapeutische und die kosmetische Hornhauttransplantation (Keratoplastik). Während die optische Keratoplastik bei Keratokonus, bullöser Keratopathie bei Pseudophakie, Hornhautnarben, -degenerationen oder -dystrophien der Visusverbesserung dient, findet die tektonische Keratoplastik ihren Einsatz bei schweren strukturellen Schäden der Hornhaut. Eine therapeutische Keratoplastik dient vor allem der Entfernung von infiziertem Hornhautgewebe, welches sich durch eine geeignete Antibiose nicht ausreichend behandeln lässt (4).

Allen gemein ist die Verwendung von Spendergewebe, welches das geschädigte Hornhautgewebe des Empfängers ersetzt (4).

1.2 Die Hornhautspende

Als Spender für eine Hornhauttransplantation kommen in Deutschland alle Verstorbenen in Betracht, die zu Lebzeiten eine Einwilligung zur Organspende unterzeichnet oder nach der erweiterten Zustimmungslösung keinen expliziten Widerspruch gegen eine Spende geäußert haben. Im letzteren Fall kann der nächste Angehörige der Entnahme sowohl zustimmen als auch widersprechen. Die Bedingungen, die dieser Angehörige erfüllen muss, um die Entscheidungsbefugnis zu erlangen, sind im Transplantationsgesetz vom 05.11.1997 festgelegt. Grundlage ist der bekannte oder der mutmaßliche Wille des Verstorbenen (15).

Liegt die Zustimmung zur Hornhautspende vor, folgen genaue Untersuchungen der Hornhautoberfläche, der Endothelzellichte (ECD) und der Serologie des Spenders, um das Gefährdungspotenzial des entnehmenden Arztes oder der Angestellten der Hornhautbank zu minimieren und die Qualität der Hornhaut für eine Transplantation zu beurteilen (16).

Genannte Untersuchungen, die durch die Mitarbeiter der Hornhautbank durchgeführt werden, erfolgen in der Regel erst nach der Hornhautentnahme, die innerhalb von 12 bis 24 Stunden (4) , maximal 72 Stunden¹ (17) nach dem Tod des Spenders erfolgen sollte. Bis zum Zeitpunkt der Transplantation werden die Hornhäute kultiviert und ihre Endothelzellqualität in regelmäßigen Abständen überprüft. In der Hornhautbank Mainz erfolgt diese Kultivierung bei $34 \pm 1^\circ\text{C}$ (16).

Zum Ausschluss der Verwendung entnommener Hornhäute führen positive Blutergebnisse des Spenderserums auf hochinfektiöse Erkrankungen wie mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) 1 und 2, Hepatitis B- und C-Virus, sowie Syphilis (15, 18).

Hinzu kommen makroskopische Veränderungen der Hornhaut wie maligne Tumoren im vorderen Augenabschnitt, Skleritiden oder Uveitiden, zentrale Hornhautvernarbungen, Keratokonus, Keratoglobus, zentrale Pterygien oder vorausgegangene chirurgische Eingriffe, die eine Verwendung des Spendermaterials ebenfalls verbieten.

Sind die Ergebnisse der Blutuntersuchung negativ und die erste makroskopische Einschätzung unauffällig, folgt eine Feinevaluierung des Hornhautendothels frühestens ab dem dritten Tag nach der Entnahme (16).

¹ Zeit in Stunden zwischen Tod des Spenders und Inkulturnahme der Hornhaut

Des Weiteren werden parallel genauere Daten anhand der Patientenakte und in Angehörigengesprächen erhoben, um weitere mögliche Ausschlusskriterien (siehe Anhang Tabelle 15, Seite 84) für eine Organspende zu erfassen (18–20).

Die genannte Feinevaluierung ermöglicht es, das Hornhautendothel qualitativ als auch quantitativ zu beurteilen und deren Endothelzelldichte möglichst objektiv zu ermitteln, um so eine Einschätzung über die Transplantierbarkeit der Hornhaut zu erhalten.

Hornhäute, die eine Endothelzelldichte > 2000 Hornhautendothelzellen pro mm^2 (CEC/ mm^2) (16, 19) aufweisen, werden als optische Hornhäute bezeichnet und eignen sich für den Einsatz als Organtransplantat. Hornhäute mit einer Endothelzelldichte von 1800 bis 1999 CEC/ mm^2 (16) erhalten hingegen lediglich das Prädikat „Notfall Hornhaut“, während Hornhäute mit Endothelzelldichten < 1800 CEC/ mm^2 nur noch tektonisch, d.h. einen Defekt abdeckend, eingesetzt werden können (16). Die Endothelzelldichte bildet hierbei einen guten Indikator für die Qualität und Funktionsfähigkeit des Hornhautendothels, spiegelt diese jedoch nicht 1:1 wider (14).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Spenderhornhäute, die nach der Explantation durch eine deutsche Hornhautbank entnommen und aufbereitet werden, können innerhalb von maximal 34 Tagen bei organkultivierenden und 14 Tagen bei kurzzeitkultivierenden Bedingungen für eine Spende verwendet werden. Innerhalb dieses Zeitraumes werden die entnommenen Sclerocorneal-Ringe im Brutschrank der Hornhautbank aufbewahrt und bis zum Zeitpunkt der klinikinternen Verwendung oder des Versands durch eine regelmäßige Erneuerung des Mediums bestmöglich mit Nährstoffen versorgt (15).

So wurden im Jahr 2017 in insgesamt 26 deutschen Hornhautbanken, 9766 Hornhäute in Kultur gebracht, davon 6405 zu Transplantationszwecken eingesetzt und 1553 Hornhäute zusätzlich aus dem Ausland, vor allem den USA, Italien, Österreich und den Niederlanden, importiert. Der wichtigste Verwerfungsgrund war mit knapp 50 Prozent aller 2930 verworfenen Hornhäute eine mangelnde Transplantatqualität aufgrund einer zu geringen Endothelzelldichte (21). Während durchschnittlich 30 Prozent aller in Kultur gebrachter Hornhäute verworfen werden (22, 23), sind es in der Hornhautbank der Universitätsmedizin Mainz bis zu 45 Prozent (24, 25). Als Ursachen hierfür wurden unter anderem abweichende Endothelzellvitalität oder zu geringe Endothelzelldichte genannt (15, 22). Knapp 40 Prozent der 391 verwendeten

Hornhäute wurden 2017 nach extern versandt, 60 Prozent wurden Klinikintern verwendet (25).

Durch derartige Versandwege, zu deren Zweck die Hornhäute zusätzlich ver- und entpackt werden müssen, erhöht sich das Risiko, dass diese in ihrem Kulturgefäß versehentlich Stoß- und Fallkräften ausgesetzt sind, die möglicherweise die Endothelzelldichte und -vitalität schädigen könnten. Aber auch die Handhabung der Hornhäute in der Hornhautbank während des Mediumwechsels oder unmittelbar vor Operation könnte dazu führen, dass im Medium befindliche Hornhäute physikalischen Kräften ausgesetzt sind. Ein sofortiger Effekt zeigt sich jedoch unter Umständen nicht direkt, sondern könnte das Hornhautendothel möglicherweise erst nach Ablauf einer gewissen Zeit durch die Entstehung von oxidativem Stress verändern und dadurch das Operationsergebnis negativ beeinflussen.

Über den Einfluss dieser physikalischen Belastungen, wie durch Stürze, Erschütterungen oder Stöße bedingte Spannungen, gibt es bislang nur sehr wenige Daten.

Ziel der Untersuchung ist daher, die Auswirkung dieser Kräfte auf organkultivierte Spenderhornhäute in zwei verschiedenen Medien zu analysieren.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Haben Fallkräfte, die in Form von Gravitation auf eine organkultivierte Hornhaut wirken, langfristigen Einfluss auf die Endothelzellquantität und folglich die Hornhautqualität?

Lässt sich als Folge dessen in der Endothelzellschicht oxidativer Stress nachweisen? Als Nebenfragestellung soll zudem darauf eingegangen werden, ob das Alter des Spenders, die Post-Mortem-Zeit (Zeit zwischen Todeseintritt und Hornhautentnahme), die Lagerungsdauer, die Messdauer und das Geschlecht, Einfluss auf die initiale Endothelzelldichte und den relativen Endothelzellverlust (ECL) haben.

Die Klärung dieser Fragestellungen lässt Rückschlüsse über die Verwendbarkeit von Hornhäuten zu, die physikalischen Fallkräften ausgesetzt waren und ermöglicht die Beantwortung der Frage, ob diese Kräfte auf dem Transportweg oder unmittelbar vor der Transplantation mit einem Endothelzellverlust einhergehen oder ob es sogar einem Verwerfen der entsprechenden Hornhaut bedarf.

2 Literaturdiskussion

2.1 Literaturrecherche in PubMed

Zur Beantwortung dieser Fragestellung erfolgte im Vorfeld eine umfangreiche Literaturrecherche vor allem in PubMed und Google Scholar.

Die bei PubMed durchgeführte und auf die Jahre 1990 bis 2018 begrenzte Suche nach verschiedenen zu dem untersuchten Thema passenden Syntaxen ergab eine unterschiedliche Anzahl an Publikationen, welche in Abb. 5 nach Jahren aufgeschlüsselt dargestellt ist.

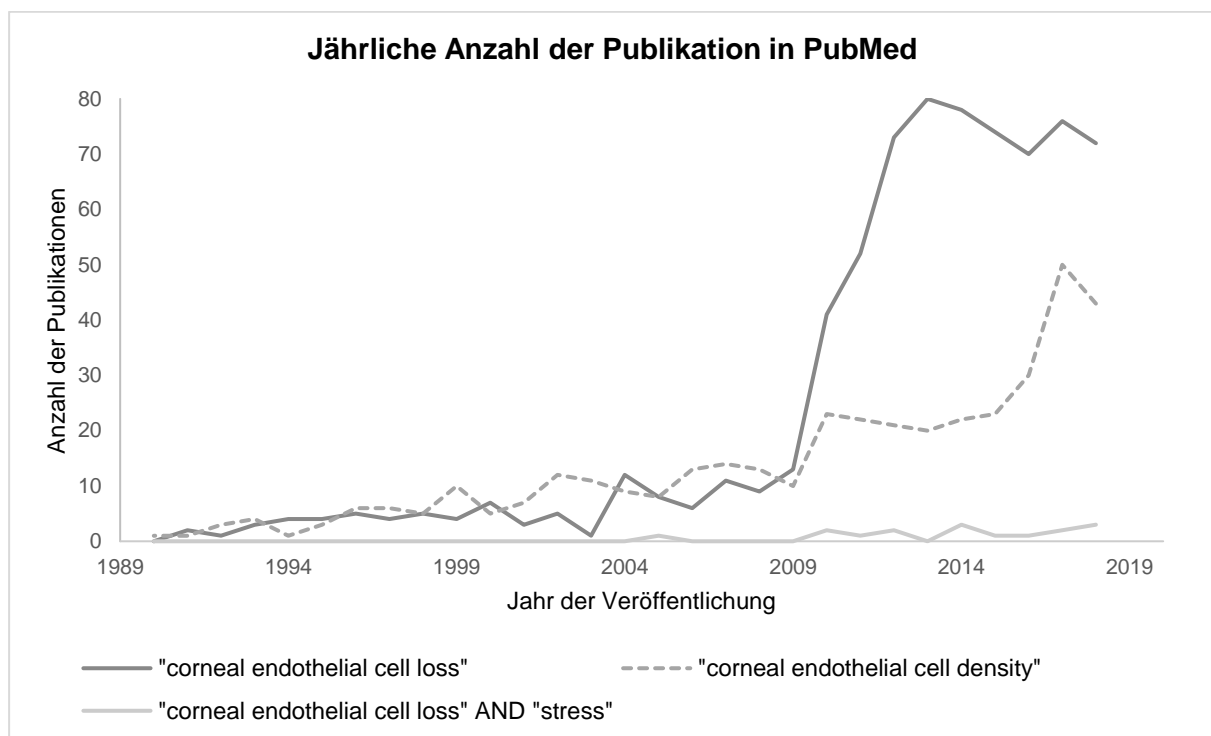


Abb. 5: Anzahl der in PubMed aufgeführten Veröffentlichungen mit dem Stichwort "corneal endothelial cell density", "corneal endothelial cell loss" und "corneal endothelial cell loss" in Kombination mit dem Stichwort "stress". Dargestellt als Liniendiagramm. (Datum der Abfrage: 05.11.2019).

Die Suchsyntax „corneal endothelial cell density“ ergab insgesamt 398 Treffer, die Suchsyntax „corneal endothelial cell loss“ 731 Treffer und die Kombination letzterer mit dem Suchbegriff „stress“ ergab 16 Treffer. Zu einer besonderen Zunahme der Publikationsdichte unter dem Suchbegriff „corneal endothelial cell loss“ kam es in den letzten 9 betrachteten Jahren mit einem Höchstwert im Jahr 2013 mit einer Publikationshöhe von 80. Im Jahr 2009 betrug diese noch 13.

Bei der gezielten Suche nach „corneal endothelial cell loss“ in Kombination mit „mechanical stress“ fanden sich insgesamt 4 Publikationen, von denen sich nur zwei Publikation auf Vorkommnisse bei der Organkultivierung bezogen (26, 27).

Zusammenfassend ergab die Auswertung der Entwicklung der Anzahl der Publikationen in PubMed eine Zunahme der Publikationen zu dem Thema Endothelzellichte und Endothelzellverlust, was das steigende medizinische Interesse an diesen Themenbereichen, insbesondere auch aufgrund der Einführung lamellärer Keratoplastiken wie der DMEK² und der DSAEK³, widerspiegelt. Besonders der Faktor Stress als Ursache für einen Endothelzellverlust ist jedoch bislang wenig in Publikationen behandelt und Teil medizinischer Untersuchungen gewesen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, sich intensiv mit den Ursachen von Endothelzellverlust (ECL) aufgrund von Stress, insbesondere mechanischem Stress in Form von Fallkräften und dadurch entstehenden oxidativen Stress, auseinanderzusetzen.

2.2 Oxidativer Stress

2.2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen

Um die Auswirkungen mechanischen Stresses auf die menschliche Hornhaut zu verstehen und oxidativen Stress infolgedessen zu untersuchen, ist es von großer Bedeutung, sich mit dem Begriff des oxidativen Stresses und in diesem Zusammenhang mit den dafür verantwortlichen Quellen reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) auseinanderzusetzen.

Für die Funktion einer Zelle ist die Aufrechterhaltung eines definierten Redoxzustands essenziell. Diesen erreicht sie durch Bildung eines Gleichgewichts zwischen reduzierenden und oxidierenden Stoffen. Kommt es aufgrund verschiedener Stoffwechselprozesse oder schädlicher Umwelteinflüsse zur übermäßigen Entstehung hochreaktiver Sauerstoff- und Hydroxylverbindungen, sogenannter Reactive Oxygen Species (ROS), kann dieses Gleichgewicht nicht aufrechterhalten werden, was zur Bildung oxidativen Stresses führt (28).

2. posteriore lamelläre Technik, bei der die Descemet-Membran und die Endothelzellschicht entnommen werden

3. posteriore lamelläre Technik, bei der die Descemet-Membran, die Endothelzellschicht und Stroma-Anteile entnommen werden

Als reaktive Sauerstoffverbindungen oder auch freie Radikale werden Moleküle, Ionen oder Atome bezeichnet, die unpaarige Elektronen aufweisen und aufgrund derer sie bestrebt sind, diese über eine chemische Bindung auszugleichen. So können sie sich untereinander verbinden und eine Radikalkombination eingehen. Hierbei handelt es sich um eine stabile Bindung. Reaktive Sauerstoffverbindungen können jedoch auch mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Körperzellen interagieren, indem sie ein Wasserstoff-Molekül aus dieser entfernen. Eine solche Reaktion wird als Wasserstoffabstraktion bezeichnet. Bei den sogenannten Redox-Reaktionen können sie dafür sorgen, dass ganze Elektronen übertragen werden. Des Weiteren sind sie dazu in der Lage, sich an Doppelbindungen, beispielsweise die der Zellmembran, anzulagern und diese so zu unterbrechen (29).

Bei derartigen Reaktionen, während derer sie mit Zellbestandteilen wie Nucleinsäuren, Proteinen oder Lipiden interagieren, stören sie deren Funktion erheblich (28) oder führen zum Tod der Zelle (29, 30). „ROS können alle Komponenten einer Zelle schädigen, u.a. durch Lipidperoxidation, Proteinmodifikation [...] oder die Bildung von 8-Oxo-Guanin in der DNA, und sie können sogar eine Apoptose der Zelle induzieren.“ (28).

Ausgangspunkt für die Entstehung von Sauerstoffradikalen sind Sauerstoffmoleküle, die einzelne „fehlgeleitete“ Elektronen (31) energieabhängig aufnehmen und sich dadurch zum hochreaktiven Superoxidradikal, bzw. -anion entwickeln (28).

Die chemische Reaktion ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Entstehung eines Superoxid-Anions (5, 29).

Substrat				Produkt
O ₂ Sauerstoff	+	e ⁻ Elektron	→	O ₂ ⁻ Superoxid-Anion

Aus ihnen bilden sich in verschiedenen spontanen, energieunabhängigen Reaktionen weitere Moleküle wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid oder ein Hydroxyl-Radikal (28, 31). Die Elektronendonatoren in biologischen Systemen sind Eisen (Fe²⁺) und Kupfer (Cu⁺) (29).

Einen Überblick über die einzelnen chemischen Reaktionen liefert Tabelle 2.

Tabelle 2: Entstehung von ROS aus einem oder mehreren Superoxid-Anionen (5, 29).

Substrat				Produkt			
2O_2^-	+	2H^+	→	H_2O_2	+	O_2	
2 Superoxid-Anionen		2 Wasserstoff		Wasserstoffperoxid		Sauerstoff	
O_2^-	+	e^-	→	O_2^{2-}			
Superoxid-Anion		Elektron		Peroxid-Anion			
O_2^{2-}	+	e^-	→	O^{2-}	+	O^-	
Peroxid-Anion		Elektron		Oxid-Anion		Oxyl-	
O^{2-}	+	2H^+	→	H_2O			
Oxid-Anion		2 Wasserstoff		Wasser			
O^-	+	H^+	→	$\text{OH}\cdot$			
Oxyl-		Wasserstoff		Hydroxyl-Radikal			
$\text{OH}\cdot$	+	$\text{H}^+ + e^-$	→	H_2O			
Hydroxyl-Radikal		Wasserstoff + Elektron		Wasser			

Die Ursachen für die übermäßige Entstehung von ROS oder ROS-Vorläufern sind vielfältig.

Shoham et al. beschäftigten sich 2008 besonders mit der Rolle des oxidativen Stresses im menschlichen Auge. Sie hielten dieses aufgrund seiner intensiven Lichtexposition und seines hohen Metabolismus besonders exponiert gegenüber oxidativem Stress (32). Serbecic, Beutelspacher et al. beschrieben 2005 speziell die Hornhaut des menschlichen Auges als empfänglich für Schäden durch ROS, da diese aus avaskulärem Gewebe bestehe und erhebliche Tagesschwankungen in der Sauerstoffversorgung aufweise. Ebenfalls sei sie aufgrund ihrer begrenzten Regenerationsfähigkeit potenziell anfällig für Oxidationsschäden, so Serbecic, Beutelspacher et al. (30), habe jedoch auch zahlreiche Abwehrmechanismen zum Abbau übermäßiger reaktiver Sauerstoffverbindungen (siehe 2.2.2, Seite 15).

Insgesamt seien biologische, chemische oder physikalische Noxe, aber auch endogene und exogene Moleküle für die Entstehung von ROS verantwortlich, so das Robert Koch-Institut (31). Berke spezialisierte diese für die menschliche Hornhaut auf ultraviolette (UV)-Strahlung, Stoffwechselprozesse besonders unter Sauerstoffmangel und Phagozytose durch Makrophagen bei Entzündungsreaktionen (29).

Im Folgenden wird auf einige der genannten Ursachen genauer eingegangen.

Bezogen auf die menschliche Hornhaut versetze UV-Strahlung die in der Hornhaut befindlichen Aminosäuren Tryptophan, Histidin, Cystein und Methionin, als auch Riboflavin in einen angeregten Zustand. Baue sich dieser wieder zurück, so werde Energie frei, die dazu verwendet werden könne, ein Elektron auf Sauerstoff zu übertragen und so die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen zu begünstigen (29).

Auch in zahlreichen Stoffwechselprozessen komme es laut Berke zur Bildung von Superoxid-Anionen. Zur Verhinderung der übermäßigen Produktion dieser werde der Großteil des Sauerstoffs in der Atmungskette der Körperzellen verbraucht und zu Wasser reduziert (29, 31). „Nur rund 2% des in der Zelle aufgenommenen Sauerstoffs werden nicht zu Wasser reduziert, sondern gelangen überwiegend als Superoxid-Anion in den Organismus.“ (29).

Besonders bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen komme es jedoch bei weiterlaufendem Elektronenfluss zu einer Unterbrechung der Atmungskette, wobei die anfallenden Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Unabhängig von der Atmungskette reagiere Sauerstoff zudem mit dem in allen Zellen vorhandenen Flavinmononucleotid und Flavinadenindinucleotid, welche Protonen und Elektronen aufnehmen und wieder abgeben können (29).

Weiter spiele im Auge auch das Vorhandensein von Phagozyten wie beispielsweise Makrophagen eine große Rolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Diese seien besonders bei geschlossenem Auge dafür verantwortlich, Krankheitserreger zu phagozytieren und so den fehlenden Lidschlag, insbesondere nachts, zu kompensieren. Gleichzeitig bilden sie jedoch in einem Prozess, der als „Oxidativer Burst“ (28) bezeichnet wird, freie Sauerstoffradikale, die sowohl Krankheitserreger als auch die Hornhaut selbst schädigen können. Beteiligte Enzyme sind hierbei die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP(H)) - Oxidase (28) und die Xanthinoxidoreduktase (29).

Genannte Enzyme sind für die Entstehung von ROS in der Hornhaut besonders wichtig. Während Oxidasen die Abgabe von Elektronen katalysieren, sorgen Reduktasen für die Aufnahme dieser (28, 29).

So führt die NADPH-Oxidase der Phagozyten unter einem enormen nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zur Bildung von Superoxid-Anionen, welche in nachfolgenden Schritten zu Wasserstoffperoxiden reduziert und/oder weiter zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgewandelt werden können (siehe 2.2.1, Seite 10) (28).

Die von der NADPH-Oxidase katalysierte Reaktion ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Katalysierte Reaktion der NADPH-Oxidase (28).

Substrat				Produkt				
NADPH	+	2 O ₂	→	NADP ⁺	+	2 O ₂ ⁻	+	H ⁺

Auch die Xanthinoxidoreduktase führt zur Bildung von Superoxid-Anionen (29).

Cejková, Ardan et al. und Cejková, Stípek et al. untersuchten 2002 und 2004 den Einfluss dieser auf die Entstehung von ROS in der menschlichen Hornhaut. Das Enzym komme in zwei Isoformen vor; der sauerstoff-reduzierenden Xanthinoxidase, welche Superoxid-Anionen bilde, und der Xanthindehydrogenase, welche NAD⁺ reduziere (6).

Laut Kooij et al. und Frederiks und Bosch stehe jedoch nicht die Bildung der Superoxid-Anionen im Vordergrund der biologischen Funktion des Enzyms, sondern vielmehr die der Harnsäure, welche eine wichtige antioxidative Wirkung innehat (siehe 2.2.2, Seite 15) (33, 34).

Bei geringer Sauerstoffkonzentration der Hornhaut komme es zu einer erhöhten Syntheserate der Xanthinoxidase, welche bei späterer Verbesserung der Sauerstoffsituation die Bildung von Superoxid-Anionen fördere (35).

Die von der Xanthinoxidoreduktase katalysierte Reaktion ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Katalysierte Reaktionen der Xanthinoxidoreduktase (28).

Substrat						Produkt				
Hypoxanthin	+	O ₂	+	H ₂ O	→	Xanthin	+	O ₂ ⁻	+	2H ⁺
Xanthin	+	O ₂	+	H ₂ O	→	Harnsäure	+	O ₂ ⁻	+	2H ⁺

2.2.2 Schutzmechanismen gegen reaktive Sauerstoffverbindungen

Um das Auge vor dem Einfluss prooxidativer Faktoren zu schützen, stellen besonders die vorderen Zellschichten der Hornhaut und der Konjunktiva, die von einem Tränenfilm bedeckt sind, eine initiale Schutzschicht gegen oxidativen Stress dar (36). Besonders das Epithel spielt hier eine Schlüsselrolle beim Schutz des inneren Auges (37).

Durch Reduktion von Superoxid-Anionen mittels antioxidativen Enzymen, wie der Superoxid-Dismutase (SOD), der Glutathion-Peroxidase, der Katalase (CAT), aber auch der Aldehyd-Dehydrogenase 3A1 und DNA-Reparaturmechanismen, können Zellschädigungen verhindert werden (28). Auch nicht-enzymatische niedermolekulare Antioxidantien haben bei der Kontrolle reaktiver Sauerstoffverbindungen einen hohen Stellenwert. So entfernen sie beispielsweise Wasserstoffmoleküle oder einzelne Elektronen von freien Radikalen (29). „Die Wirkung der Antioxidantien, zu denen u.a. in der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit Vitamin E, Harnsäure, Vitamin C und Glutathion zählen, entspricht denen der freien Radikale selbst, nur das[s] sie ihre Wirkung nicht gegen biologische Moleküle, sondern gegen freie Radikale ausüben.“ (29).

Dadurch bilden sie zusammen mit den enzymatischen Antioxidantien ein stabiles System zur Verhinderung oxidativen Stresses, wie er beispielsweise bei hoher UV-Strahlung auftreten kann (6).

Während der Tränenfilm vor allem nicht-enzymatische Antioxidantien aufweist, verfügt er nur über geringe Mengen enzymatischer Antioxidantien. Erstere untersuchten Gogia, Richer et al. 1998 anhand des Tränengehalts bei Basalsekretion. Sie wiesen sowohl Ascorbinsäure, Glutathion, Harnsäure als auch die Aminosäuren Cystein und Tyrosin nach (38). Daneben seien laut Berke auch eisenbindende Proteine, wie

beispielsweise Lactoferrin von großer Bedeutung, da sie die DNA-Synthese vieler Bakterien im Tränenfilm verhindern, die auf Eisen als Cofaktor angewiesen sind (29). Eine besonders hohe Konzentration von Ascorbin- und Harnsäure ist allerdings nicht nur im Tränenfilm vorzufinden, sondern ebenfalls im zentralen Hornhautepithel, wo beide Substanzen als eine Art UV-Filter, tiefere Hornhautschichten schützen sollen, so Berke (29). Im Kammerwasser ist die Konzentration von Ascorbinsäure jedoch am höchsten, so Bode, Vanderpool et al.. Hier übersteigt sie die des Plasmas bis zu 20-fach. Diese Anreicherung erfolgt durch aktive Transporter des Ziliarepithels, welche Ascorbinsäure aus dem Plasma in die Kammer transportieren (39). Auch die Hornhautendothelzelle verfügt über energieunabhängige Transporter, die diese nicht-enzymatischen Antioxidantien, allem voran die Ascorbinsäure, aus dem Kammerwasser extrahieren. Hierfür wird die Ascorbinsäure kurz nach Aufnahme in die Endothelzelle zu Dehydro-L-Ascorbinsäure reduziert und darauffolgend in das Stroma transportiert. Dort bildet sie dann eine Art Reserve, die freigesetzt wird, sobald oxidativer Stress auftritt (39). Neben Ascorbinsäure findet sich in der Endothelzelle zudem auch Vitamin A und E (40), sowie Glutathion, das vor allem durch die Glutathion-Peroxidase (siehe unten) bereitgestellt wird und ebenfalls antioxidativ wirkt (29). Die Wirkung von Vitamin E, genauer DL-alpha-tocopherol-acetat, beruht darauf, dass es die Ketten reaktiver Sauerstoffspezies bricht und diese so inaktiviert (41).

Neben diesen nicht-enzymatischen Antioxidantien finden sich zudem noch einige Enzyme, wie die bereits zuvor erwähnte Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Katalase und Aldehyd-Dehydrogenase 3A1, die als Antioxidantien fungieren.

Während die Aldehyd-Dehydrogenase 3A1 UV-Strahlung direkt absorbiert (42) und so die Hornhaut unmittelbar schützt, sorgt die Superoxid-Dismutase für einen Abbau bereits entstandener Superoxid-Anionen, um die Bildung des schwer kontrollierbaren Hydroxyl-Radikals zu verhindern (29).

Produkt der Superoxid-Dismutase ist molekularer Sauerstoff und das weniger reaktionsfreudige Wasserstoffperoxid, welches in einem weiteren Schritt durch das Enzym Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut wird (28). Dadurch wird zudem die Superoxid-Dismutase selbst vor Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid geschützt (6).

Die von der Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (CAT) katalysierte Reaktion ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Katalysierte Reaktionen der Superoxid-Dismutase und der Katalase (28).

Substrat				Produkt		
2 O_2^-	+	2 H^+	$\xrightarrow{\text{SOD}}$	H_2O_2	+	O_2
$2 \text{ H}_2\text{O}_2$			$\xrightarrow{\text{CAT}}$	$2 \text{ H}_2\text{O}$	+	O_2

Wasserstoffperoxid kann jedoch ebenfalls durch das Enzym Glutathion-Peroxidase abgebaut werden (29), was in Tabelle 6 dargestellt ist.

Tabelle 6: Katalysierte Reaktion der Glutathion-Peroxidase (29).

Substrat				Produkt		
2 GSH	+	H_2O_2	\rightarrow	GSSG	+	$2 \text{ H}_2\text{O}$

Behndig, Svensson et al. beschäftigten sich 1998 mit den verschiedenen Isoformen der Superoxid-Dismutase (SOD) und deren Lokalisation im visuellen System.

Während es sich bei der SOD-1 und der SOD-2 um intrazelluläre Enzyme handelt, findet sich die SOD-3 extrazellulär vor allem in Bindegewebe, an Basalmembranen oder an Zelloberflächen (43), da sie eine hohe Affinität zu Kohlenhydraten aufweist (29).

Bereits 1991 wiesen Untersuchungen von Crouch, Goletz et al. eine Enzymaktivität der SOD-1 in der Tränenflüssigkeit nach (44), welche jedoch laut Behndig, Svensson et al. nur sehr gering sei und damit nicht die Hauptquelle der antioxidativen Enzyme darstelle (43). Höhere Konzentrationen der SOD-1, der SOD-2 sowie der SOD-3 fanden sie im Epithel, im Stroma und im Endothel der Hornhaut (32, 43, 45).

In der Tränenflüssigkeit fanden Crouch, Goletz et al. im Gegensatz zur SOD-1 keine Enzymaktivität der Katalase und der Glutathion-Peroxidase (44), allerdings zeigte sich diese bei Untersuchungen von Cejková, Vejrazka et al. sowohl im Endothel, Epithel als auch in weiteren Zellen der Hornhaut untersuchter Kaninchen (45). Auch Atalla, Sevanian et al. beschäftigten sich mit der Lokalisation der Katalase und der Glutathion-

Peroxidase im Auge und kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie Cejková, Vejrazka et al. (46). Hierbei scheint besonders das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion für die Funktionalität der entsprechenden Zellen von großer Bedeutung zu sein, was auf die große Relevanz der Glutathion-Peroxidase hindeutet, so Berke (29).

Zusammenfassend verfügt die Hornhaut unter physiologischen Bedingungen über zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien, die sie vor den Auswirkungen oxidativen Stresses schützen (6, 7).

Faragher, Mulholland et al. schlossen daraus, dass eine Abnahme antioxidativer Enzyme, wie es zum Beispiel physiologisch mit zunehmenden Alter der Fall ist (4), zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses führt und speziell an der Hornhaut mit einer Abnahme der Endothelzellichte einhergeht (47). Dies bestätigten Cejková, Vejraska et al., die eine Verringerung der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase in Hornhäuten von Kaninchen in höheren Altersstufen nachwiesen (45).

Dennoch sei nicht allein das biologische Alter für die Zunahme oxidativen Stresses und die damit verbundene Abnahme der Endothelzellichte verantwortlich. Den Umwelteinflüssen komme hier laut Faragher, Mulholland et al. ebenfalls eine große Bedeutung zu. Aufgrund dessen sei die Messung der Endothelzellichte kein zuverlässiger Index des chronologischen Alters einer Hornhaut, so Faragher, Mulholland et al. (47).

Mit diesen nicht-physiologischen Umwelteinflüssen oxidativen Stresses beschäftigten sich weitere Untersuchungen, die sowohl die Auswirkungen dieser Einflüsse auf die Endothelzellzahl in vivo als auch in vitro beobachteten und die im Folgenden genauer beschrieben werden. In Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Studie beschränkt sich hierbei die anschließende Darstellung auf Untersuchungen zu mechanischen Einflüssen bzw. Traumata, die mit einem Endothelzellverlust in Verbindung gebracht werden.

2.3 Mechanisches Trauma

Als somatisches Trauma werden akute Ereignisse bezeichnet, die durch äußere Einflüsse zur Ausbildung eines körperlichen Schadens führen. Dieser kann sich sowohl in Form von Verletzungen lebender Gewebestrukturen als auch in deren Funktionsstörung äußern. Die Einflüsse, bzw. Kräfte können sowohl thermisch, chemisch, strahlenbedingt oder mechanisch sein (48).

Bei dem mechanischen Begriff der Kraft handelt es sich um eine physikalische Größe, die von Isaac Newton 1686 (49) erstmalig in Form dreier Grundsätze, der Newton'schen Axiome (49), beschrieben wurde (50). Die Kraft (actio) definierte er als die Ursache einer Beschleunigung oder Verformung eines Körpers, die durch eine ebenso große Gegenkraft (reactio) hervorgerufen werde, die als Folge der Krafteinwirkung entstehe (49, 50). „Zu jeder Wirkung (Kraft) gehört eine gleich große, ihr entgegen gerichtete Wirkung.“ (49). Die Einheit der Kraft (F) ist Newton (N) (49).

Bezogen auf einzelne Zellen, auf die eine solche Kraft einwirkt, steht insbesondere die Verformung und die Schädigung dieser als Folge der Krafteinwirkung im Vordergrund. Während sich bei der elastischen Verformung die Form des Körpers nach der Krafteinwirkung wieder zurück bildet, ist dies bei der plastischen Verformung nicht der Fall (51).

Auch Körperzellen, die aufgrund einer mechanischen Krafteinwirkung verformt werden, können je nach Struktur der Zelle und nach Stärke der Kraft durch diese reversibel oder irreversibel geschädigt oder in die Apoptose oder Nekrose getrieben werden (52).

Derartige Schäden, die auf einzelne Zellen oder Zellverbände einwirken, waren Gegenstand zahlreicher Studien und experimenteller Untersuchungen der vergangenen Jahre. Auch die Auswirkungen mechanischer Traumata auf die Endothelzellschicht der Hornhaut durch Krafteinwirkung in Form von Druck oder Fall wurden zunehmend untersucht (26, 53–56) und sollen im Folgenden dargestellt werden.

2.3.1 Einfluss von extra- und intraokulärer Kraft auf die Endothelzelldichte intakter Bulbi

Bereits 1993 beschäftigten sich Fukagawa, Tsubota et al. mit den Auswirkungen direkter Krafteinwirkung durch das plötzliche Öffnen eines Airbags auf die Endothelzelldichte der Hornhaut. Hierzu untersuchten sie 82 Schweinebulbi, die in einem Versuchsmodell einer aus Metall bestehenden Orbita eines Crashtest-Dummies befestigt und mit Airbags unterschiedlicher Inflationsstärke und Gewicht in Kontakt gebracht wurden.

Schädigungen der Endothelzellschicht wurden durch anschließende Trypan-Blau- und Alizan-Rot-Färbung sichtbar gemacht. Während Trypan-Blau als Indikator für Schädigungen der Zellmembran eingesetzt wurde, sollte Alizan-Rot Schädigungen der Descemet-Membran abbilden. Hierbei zeigte sich, dass in den Interventionsgruppen sowohl Endothelzellverluste, Schädigungen der Descemet-Membran als auch Schädigungen der Zellmembran auftraten. Den größten Endothelzellverlust stellten Fukagawa, Tsubota et al. bei einer Cornea-Airbag-Entfernung von 240mm fest, wobei die Höhe der Zellschädigung mit der Höhe der Inflation des Airbags korrelierte, nicht jedoch mit dessen Gewicht. Daraus schlossen sie, dass die Schädigung der Endothelzellschicht durch den direkten Kontakt von Hornhautendothel und Iris, bzw. Linse hervorgerufen werde, welcher bei stärkerer Inflation des Airbags proportional höher sei. Des Weiteren vermuteten sie, dass die Verformung der Endothelzelle, welche durch die plötzliche Deformierung der Hornhaut verursacht werde, eine mögliche Ursache des Endothelzellverlusts sein könnte (55).

Auch Motley, Kaufman et al. untersuchten 2003 die Auswirkungen von stumpfen Traumata durch Airbags auf die Endothelzelldichte menschlicher Hornhäute; konzentrierten sich jedoch besonders auf die entstehenden Schädigungen der Endothelzellen bei pädiatrischen Patienten. Hierzu untersuchten sie die Daten von 16 Kindern zwischen 3 und 16 Jahren, die als Folge eines Autounfalls ein okuläres Trauma in Form von Schädigungen der Hornhaut, des vorderen Kammerwinkels, der Iris, der Linse, der Netzhaut, der Aderhaut oder des Sehnervs erlitten hatten. Bei 100 Prozent der Kinder fanden sie ein periokuläres Ödem und bei \pm 50 Prozent eine Abtragung der Epithelzellschicht (Erosio corneae) und/oder ein Hornhautödem. Bei 6 der 16 Kinder wurde innerhalb von 2,5 bis 5 Jahren nach dem Trauma eine Endothelzelldichtemessung vorgenommen. Motley, Kaufman et al. fanden hierbei einen Unterschied von 547 CEC/mm² zwischen dem Mittelwert der Endothelzellzahl

der Trauma- und der Kontrollgruppe, wobei die Endothelzellichte der Traumagruppe statistisch signifikant geringer war als die der Kontrollgruppe (56).

Ähnliche Schädigungen beschrieben Vohra und Chawla 2017 in einer Falldarstellung einer Patientin, bei der es nach einem Autounfall neben einem Lidödem, einer Erosio corneae, einem zentralen Hornhautödem und einer milden Vorderkammer-Reaktion, zu einem Verlust morphologisch normaler Endothelzellen gekommen war. Folgeuntersuchungen zeigten, dass nach einem Monat die Endothelzellzahl wieder zugenommen hatte, die Zellen jedoch weiterhin eine unterschiedliche Größe und Form aufwiesen.

Als mögliche Ursachen für das beschriebene initiale Ödem nannten Vohra und Chawla (54) die lokalisierte Torsion von Endothelzellen an der Stelle des maximalen Aufpralls auf die vordere Hornhautoberfläche oder analog zu Fukagawa, Tsubota et al. (55) sowie Motley, Kaufman et al (56). den direkten Kontakt des Endothels mit der Linsenvorderseite und der Irisoberfläche (54).

Drücke, die nicht von außen, d.h. auf die Epithelzellschicht der Hornhaut einwirken, sondern ihren Effekt direkt auf die Endothelzellschicht ausüben, waren Gegenstand weiterer Studien der vergangenen Jahre.

So untersuchten Li, Zhang et al. 2017 die Auswirkungen von erhöhtem intraokulärem Druck bzw. Augeninnendruck auf die Endothelzellschicht der Hornhaut lebender Ratten (8). Hierzu kanalisiert sie die Vorderkammern 84 anästhesierter Tiere und konnektierten diese mit einem Reservoir steriler Spüllösung (BSS-Lösung). Durch Anhebung des Reservoirs über das Höhenniveau der Ratte hinaus, entstand ein erhöhter intraokulärer Druck im Auge des untersuchten Tieres, welcher für zwei Stunden aufrechterhalten wurde. Die Bestimmung des Augeninnendrucks erfolgte kontinuierlich mittels Non-Contact-Tonometrie und betrug im Mittel 82.6 ± 2.3 mmHg. Während ein langsamer Anstieg des intraokulären Druckes nicht zu einer Veränderung der Endothelzellichte führte, kam es bei einer schnellen akuten Erhöhung zu einem Hornhautödem, einer Störung der Zusammensetzung des Zytoplasmas, einem Strukturverlust des Zytoskeletts, einer Störung der Expression der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, einer Pyknose (Vorstufe der Apoptose) und einem Endothelzellverlust. Die Folgen einer zweistündigen Erhöhung des Augeninnendrucks seien jedoch größtenteils reversibel, so Li, Zhang et al. Während sich die Größe der Endothelzellen zuerst normalisierte, brauchte die Zelle weitaus länger, ihre ursprüngliche Morphologie

wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu regeneriere sich die Expressionsrate der Na⁺-K⁺-ATPase nicht vollständig (8).

Auch Janson, Alward et al. beschäftigten sich 2018 mit den Auswirkungen von erhöhtem intraokulärem Druck auf die Endothelzellschicht der Hornhaut. Sie beschrieben unter anderem Untersuchungen von Sihota, Lakshmaiah et al., welche sich in erster Linie mit dem akuten, subakuten und chronischen primären Engwinkelglaukom beschäftigten (57). Hierzu untersuchten sie 2003 30 Patienten mit primären Engwinkelglaukom zwischen 40 und 75 Jahren und verglichen die erhobenen Daten mit 30 alters- und refraktionsangepassten gesunden Patienten der Kontrollgruppe. Die Bewertung der Augen erfolgte mittels Goldmann-Appplanationstonometrie, Gonioskopie und Durchführung eines Ultraschall-A-Scans. Die Dichte der Hornhautendothelzellen wurde unter Verwendung eines Kontakt-Spekularmikroskops gemessen und erst ermittelt, sobald der intraokuläre Druck für mindestens 2 Wochen auf Werte unter 21 mmHg eingestellt worden war.

Hierbei zeigten Sihota, Lakshmaiah et al, dass sich die Endothelzellichte bei Patienten mit akutem und chronischem primärem Engwinkelglaukom signifikant verringerte, wobei bei letzterem die Dauer des intraokulären Druckes und der Endothelzellverlust miteinander korrelierte (14, 57).

Auch Sugar, Tanner et al. bestätigten, dass es bei erhöhtem intraokulärem Druck zu einer Reduktion der Funktion der Endothelzellen komme. Im Rahmen der „Cornea Donor Study“, einer aus 1090 Probanden bestehenden, multizentrischen, prospektiven, doppelblinden, kontrollierten Studie, zeigten sie, dass die Rate des Hornhauttransplantat-Versagens bei Patienten mit präoperativem Glaukom 5 Jahre nach der Operation höher sei, als bei solchen, die nicht an präoperativem Glaukom litten (58).

Bereits 1997 untersuchten Gagnon, Boisjoly et al. die Ursachen für diese negativen Auswirkungen von erhöhtem intraokulärem Druck auf die Endothelzellichte. Hierzu verglichen sie 102 Glaukom-Patienten mit 52 gesunden Probanden derselben Altersgruppe hinsichtlich ihrer Endothelzellichte. Erfasst wurden neben Alter, Geschlecht, Ethnie, Glaukom-Typ, Krankheitsdauer, Laser-Behandlung und Medikation auch die in der Vergangenheit dokumentierten intraokulären Drücke. Die Dichte der Hornhautendothelzellen wurde nach 24 Monaten unter Verwendung eines Kontakt-Spekularmikroskops erfasst und mittels computergestützter Planimetrie

ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Endothelzelldichte bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom signifikant kleiner war als bei denen mit primärem Engwinkelglaukom, beide Gruppen jedoch signifikant niedrigere Endothelzellichten aufwiesen als die der gesunden Kontrollgruppe. Eine mögliche Ursache für den hohen Endothelzellverlust sahen Gagnon, Boisjoly et al. in der direkten Kompression der Endothelzellen durch den erhöhten intraokulären Druck, der ebenfalls zu einer Schädigung der Papille, einer Optikusneuropathie und als Folge dessen zu Gesichtsfeldausfällen führt (4). Dennoch lasse sich eine genaue Ursache nicht ausmachen, so Gagnon, Boisjoly et al. (59).

Neben erhöhtem Augeninnendruck führe laut Kim, Cristol et al. ebenfalls der Kontakt der Endothelzellen mit in die Vorderkammer gelangten Luftblasen zu einem Verlust dieser (60). Dies geschehe vor allem bei der Phakoemulsifikation, bei der die Linse durch Ultraschall zerkleinert, abgesaugt und durch eine künstliche Linse ersetzt wird. Luft könne laut Kim, Cristol et al. durch die hierfür nötigen Schnitte am Rand der Hornhaut in die Vorderkammer des Auges gelangen, dort umherwirbeln und sich an die hintere Hornhautoberfläche anlagern und dort die Endothelzellen ringförmig schädigen. Um die Folgen dieser Lufteinschlüsse zu evaluieren, untersuchten sie 1997 unter verschiedenen Bedingungen den Einfluss von Luft auf menschliche Spenderbulbi in vitro und anhand von Kaninchen-Bulbi in vivo.

Die Endothelzelldichte wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie ermittelt.

Hierbei zeigte sich, dass Luftblasen sowohl bei der Phakoemulsifikation, der Spülung mit steriler Spüllösung (BSS-Lösung), als auch bei der direkten Einbringung in die Vorderkammer zu einem erheblichen Endothelzellverlust untersuchter Hornhäute führe. Die Ursache hierfür sahen Kim, Cristol et al. in der Überschreitung der Elastizitätsgrenze der Endothelzellen durch den Kontakt dieser mit den Luftblasen, was in einer Lyse der Zelle resultiere (60).

2.3.2 Einfluss von Kraft auf die Endothelzellichte organkultivierter Hornhäute

Während bei vorherigen Studien der Einfluss von Kraft auf die Endothelzellichte der Hornhaut anhand ganzer Bulbi in vivo, sowie in vitro untersucht wurde (54–56), beschäftigten sich Ramirez-Garcia, Khalifa et al. 2018 mit organkultivierten Hornhauttransplantaten in vitro.

Hierzu entwickelten sie ein Versuchsmodell, welches mithilfe einer drei Millimeter großen Edelstahlkugel ein mechanisches Trauma unterschiedlicher Stärke auf zu untersuchende Hornhautstanzen von Schweinen ausübte.

Die für den Versuchsaufbau notwendigen Hornhautstanzen wurden hierfür mittels einer Einweg-Biopsie-Stanze aus entnommenen Sclerocorneal-Ringen gewonnen und anschließend mit einem Cyanoacrylat-haltigem Spezialkleber auf einem an einem Mikroskop fixierten starren Testgerät befestigt. Hierbei wurde die natürliche Krümmung der Hornhautstanze aufgehoben. Anschließend spannten Ramirez-Garcia, Khalifa et al. den Edelstahlträger, auf dem die Edelstahlkugel befestigt war, und erreichten so beim Zurückschnellen des Trägers die Berührung der Edelstahlkugel mit der Hornhautstanze entsprechend der gewünschten Stärke.

Die auf die Hornhautstanzen ausgeübten Drücke von 0 mN, 0,65 mN bzw. 9 mN ermittelten Ramirez-Garcia, Khalifa et al. auf Basis intraoperativer Druckbelastungen durch aufliegende Kontaktlinsen oder dem Fassen der Hornhäute mit dem Forceps. Hierauf basierend bildeten sie ein Versuchsmodell bestehend aus einer Kontrollgruppe (0 mN), einer Kontaktgruppe (0,65 mN) und einer Kraftgruppe (9 mN) mit je 10 Hornhautstanzen.

Mikroskopische Aufnahmen des Zentrums der Hornhautstanzen wurden sowohl vor dem Versuchsbeginn als auch unmittelbar danach angefertigt. Insbesondere die Einkerbungsstelle der Edelstahlkugel wurde hierbei genau untersucht, um die anschließende Quantifizierung der Endothelzellichte zu erleichtern.

Ramirez-Garcia, Khalifa et al. kamen zu dem Ergebnis, dass mechanische Drücke der Stärke der Kontaktgruppe (0,65 mN) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (0 mN) zu keinem signifikanten Endothelzellverlust führen. Dieser zeigte sich jedoch beim Vergleich der Hornhäute der Kraftgruppe (9 mN) mit denen der Kontrollgruppe (0 mN). Hier stieg der Endothelzellverlust in allen Bereichen der Hornhaut signifikant nach Durchführung des Versuchsablaufs an, obwohl die Dichte der verletzten bzw. toten Endothelzellen vor Beginn in beiden Gruppen vergleichbar war. In der Kraftgruppe

zeigte sich besonders im Zentrum der Kraftereinwirkung der stärkste Endothelzellverlust. Daraus schlossen Ramirez-Garcia, Khalifa et al., dass Drücke von 10.25 kPa (= 76.88 mmHg) und höher, was 55% des Spitzendrucks entsprach, zu einem Endothelzellverlust führen können. Bei Drücken kleiner 5,7 kPa (= 42.75 mmHg) falle der mittlere Endothelzellverlust in den Bereich des Endothelzellverlustes der Kontrollgruppe und sei somit nicht mit einer zusätzlichen Schädigung der Zellen bedingt durch die Druckausübung assoziiert.

Ramirez-Garcia, Khalifa et al. schlussfolgerten, dass nur bei sehr geringen Drücken (< 5,7 kPa) von keinem Endothelzellverlust ausgegangen werden kann und aufgrund dessen die bisweilen etablierte „No-Touch“-Richtlinie weiterhin richtungsweisend sein sollte.

Dass mechanische Kräfte, die auf bereits entnommene Sclerocorneal-Ringe einwirken, mit einem Endothelzellverlust einhergehen können, zeigten auch Untersuchungen von Bhadange, Lautert et al. 2018. Diese beschäftigten sich unter anderem mit den Auswirkungen von hypoxischen Stoffwechsellagen organkultivierter Hornhäute, welche teilweise zuvor mittels eines Ultraschallimpulses mechanischem Stress ausgesetzt worden waren.

Anhand von 84 von Kaninchen stammenden Hornhäuten analysierten sie den Einfluss beider Faktoren getrennt voneinander als auch in Kombination. Hierfür applizierten sie für zwei Sekunden einen Ultraschallimpuls der Stärke 22,5 kHz (61) auf die sich im Kulturmedium befindlichen, auf ihrem Epithel aufliegenden Hornhäute. Endothelzellschäden wurden anschließend mittels Trypan-Blau-Färbung nachgewiesen.

In einer weiteren Versuchsreihe wiederholten sie ihr Vorgehen in ähnlicher Weise bei 36 menschlichen Spenderhornhäuten, die nicht für eine Keratoplastik verwendet werden konnten. Aufgrund des größeren Endothelzellverlustes noch vor Versuchsbeginn wurde dieser bei Auswertung der Ergebnisse von dem zuletzt mittels Trypan-Blau-Färbung festgestellten Endothelzellverlust abgezogen. Insgesamt zeigte sich, dass mechanischer Stress, ausgelöst durch einen zwei Sekunden andauernden Ultraschallimpuls, zu einem Endothelzellverlust in Höhe von ± 50 Prozent der initialen Endothelzellendichte führte, welcher durch eine Kombination mit Hypoxie (0,5% O₂ für zwei Stunden) statistisch signifikant um 19 Prozent bei humanen Sclerocorneal-

Ringen und 29 Prozent bei Sclerocorneal-Ringen von untersuchten Kaninchen verringert werden konnte.

Neben diesem protektiven Effekt hypoxischer Stoffwechsellagen zeigten Bhadange, Lautert et al. somit auch die Auswirkungen von mechanischer Kraft durch Ultraschall, die letztlich in Form von Schallwellen die Endothelzellschicht der Hornhäute in mechanische Schwingungen versetze und diese dadurch schädige (62).

Diese Kraftübertragung erfolge laut Newton in jeder Situation, in der eine mechanische Kraft auf einen Körper, wie zum Beispiel eine Hornhaut-Endothelzelle, einwirke. Entstehe eine Kraft beispielsweise durch den Fall eines Körpers aufgrund von Gravitation, so übertrage sich diese Kraft bei Aufprall des Körpers in gleicher Höhe auf diesen (49, 63). Die Gravitation als solches bezeichnete er 1687 als eine fernwirkende Kraft, die zwei Körper aufeinander ausüben, welche jedoch relativ schwach sei (63). Dadurch könne ein Körper, der von der Erdanziehungskraft angezogen werde, nicht durch die Erdoberfläche hindurchdringen, sondern werde durch die elektromagnetische Kraft zwischen Körper und Erdoberfläche abgestoßen (64).

Die Kraft, die durch die Abstoßung auftrete, auf den Körper einwirke und diesen schädige, beobachteten Rosenbaum, Reinhard et al. 2004 anhand organkultivierter Spenderhornhäute, die aus einer zuvor festgelegten Höhe in einer standardisierten Blechschiene fallen gelassen wurden.

Bei den untersuchten Hornhäuten handelte es sich um 20 humane Sclerocorneal-Ringe, die aufgrund von Ausschlusskriterien nicht für eine Keratoplastik verwendet werden konnten und eine initiale Endothelzelldichte von ≥ 1600 CEC/mm² aufwiesen. Nach siebentägiger Kultivierung in M1-Medium (für die Zusammensetzung siehe Anhang Tabelle 16, Seite 85) und einer 12-stündigen Entquellzeit in dem Transportmedium M2-Medium (für die Zusammensetzung siehe Anhang Tabelle 16, Seite 85) wurden die Hornhäute in Kontroll- und Interventionsgruppe randomisiert.

Während alle Hornhäute der Kontrollgruppe bis zum Ende der Versuchsreihe bei 34,5°C in M1-Medium gelagert wurden, wurden die Hornhäute der Interventionsgruppe in ein Glasgefäß mit Transportmedium überführt, verplombt, in eine Styroporbox verpackt und anschließend 100-mal aus exakt derselben Höhe entlang einer Blechschiene fallen gelassen. Danach erfolgte die erneute Überführung in M1-Medium. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurde an Tag 8 ein Mediumwechsel aller Hornhäute zu M2-Medium durchgeführt und nach einer

Entquelldauer von 12 Stunden eine erneute Messung der Endothelzelldichte durchgeführt.

Rosenbaum et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Erschütterungen, die durch den Fall von transportfertig verpackten Spenderhornhäuten aus einer zuvor definierten Höhe entstehen, die Endothelzelldichten dieser nicht negativ beeinflussen können. Aufgetretene Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe zeigten sich im Vergleich mit dem 2-seitigen unpaarigen t-Test als statistisch nicht signifikant (53). Die Kraft, die bei Aufprall des Gefäßes entstand, wurde mittels Stoßindikatoren ermittelt und lag hierbei bei mindestens 100 g.

2.4 Zusammenfassung

Traumata, die in Form von mechanischen Kräften auf Zellen einwirken, sind je nach Intensität dazu in der Lage, die Funktion oder Struktur dieser zu schädigen oder ihre Apoptose zu induzieren. Ursache hierfür ist die sogenannte Gegenkraft (*reactio*), die durch die Einwirkung der Kraft (*actio*) in der Zelle als Reaktion auf diese entsteht (49) und sich unter Umständen als Verformung (51) dieser äußert.

Dadurch wird die Zelle in einen Stresszustand versetzt, bei dem es als Folge dessen zu der Entstehung eines Ungleichgewichts zwischen oxidierenden und reduzierenden Stoffen mit einem Überwiegen ersterer kommt. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet (28).

Ursachen für die Entstehung eines solchen Stresses, insbesondere im Auge, sind neben der beschriebenen mechanischen Krafteinwirkung (31) auch UV-Strahlung, Stoffwechselprozesse, Sauerstoffmangel, Phagozytose durch Makrophagen und Entzündungsprozesse (29). Dadurch kommt es vermehrt zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS), die entweder spontan oder durch Aktivierung der NADPH-Oxidase (28) oder Xanthinoxidoreduktase (29) gebildet werden.

Um speziell die Hornhaut vor dem Einfluss prooxidativer Faktoren zu schützen, stellen besonders die vorderen Zellschichten dieser, zusammen mit der Konjunktiva und dem Tränenfilm, eine initiale Schutzschicht gegen oxidativen Stress dar. Zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Vitamin E, Harnsäure, Vitamin C und Glutathion, aber auch die Aminosäuren Cystein und Tyrosin (29, 38). Enzymatische Antioxidantien sind vor allem die Superoxid-Dismutase (SOD), die Glutathion-

Peroxidase, die Katalase, aber auch die Aldehyd-Dehydrogenase 3A1 und DNA-Reparaturmechanismen (28, 29).

Auch die Endothelzellschicht der Hornhaut verfügt über Antioxidantien, die für den Erhalt eines ausgeglichenen Redoxzustands verantwortlich sind. Hier finden sich vor allem die SOD 1-3, die Glutathion-Peroxidase, aber auch die Katalase bei den enzymatischen und Ascorbinsäure, Vitamin A und E und Glutathion bei den nicht-enzymatischen Antioxidantien (29, 43–46).

Unter physiologischen Bedingungen schützen genannte enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien die Hornhaut vor den Auswirkungen oxidativen Stresses bei normaler Stoffwechsellage (6, 7). Kommt es jedoch zu einem starken Anstieg prooxidativer Faktoren, wie es beispielsweise durch eine physikalische Krafteinwirkung der Fall ist (31), sind die genannten Antioxidantien nicht mehr dazu in der Lage, die Prooxidantien zu kompensieren. Bezogen auf die Endothelzellschicht der Hornhaut führt dies zu einem Verlust von Endothelzellen und einer damit verbundenen Funktionsminderung der Hornhaut (47).

Bestätigt wurde dies durch in vitro als auch in vivo Studien der Hornhaut, die eine Erhöhung des Endothelzellverlustes nach mechanischen Krafteinwirkungen nachwies (8, 26, 27, 53–60). Untersuchungen mit kultivierten Spenderhornhäuten ergaben, dass ein direkter Kontakt der Hornhautoberfläche mit einem nicht-traumatischen Fremdgegenstand bei einer Druckeinwirkung von $< 5,7$ kPa nicht bzw. bei $\geq 10,25$ kPa durchaus mit einem Endothelzellverlust assoziiert ist (26). Auch eine direkte mechanische Druckeinwirkung auf die Hornhautoberfläche, wie sie durch das Öffnen eines Airbags entsteht, führt sowohl zu einer Schädigung des Hornhautendothels als auch der Descemet- und der Zellmembran (54–56). Eine mögliche Ursache hierfür sei der direkte Kontakt von Endothel und Linsenvorderseite oder Irisoberfläche (54–56). Druck, der direkt auf die Endothelzellschicht wirkt, wie er bei erhöhtem intraokulärem Druck, Lufteinschlüssen oder Ultraschall auftritt, sei ebenfalls mit einem erhöhten Endothelzellverlust assoziiert (8, 14, 27, 57–60). Endothelzellverlust, der durch Gravitation in Form von Erschütterungen auf organkultivierte im Transportgefäß befindliche und in einer Styroporbox verpackte Hornhäute entsteht, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (53).

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es zu einer Schädigung der Endothelzellschicht durch höhere Fallkräfte kommt. Diese könnten beispielsweise

durch das Fehlen des Styroporgefäßes hervorgerufen werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass hierbei direkte Kontaktdrücke mit dem Glasgefäß entstünden, die 5,7 kPa überschreiten könnten und welche bis dato lediglich anhand vollständiger Bulbi oder in vivo beschrieben wurden.

Um mögliche Folgen von Gravitationskräften auf die Endothelzelldichte organkultivierter Hornhäute zu identifizieren, beschäftigt sich die vorliegende Studie gezielt mit den Auswirkungen von Fallkräften auf lediglich im Transportgefäß und Medium befindliche Hornhäute. Vor allem der langfristige Verlauf der Endothelzelldichte, sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und die damit verbundene Stoffwechsellage des oxidativen Stresses steht hierbei im Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Hypothese formuliert und getestet, dass der Fall eines in einem Transportgefäß befindlichen Sclerocorneal-Rings aus 1,2m Höhe zu einem zeitabhängigen Endothelzellverlust führt.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmodell menschliches Hornhauttransplantat

Zur Untersuchung der Morphologie und der Quantität der Hornhautendothelzellen wurden 24 menschliche Spenderhornhäute verwendet, die für die wissenschaftliche Forschung freigegeben waren und aufgrund positiver Serologien (HIV, Hepatitis B oder C, Treponema pallidum (18)), schlechten Ausgangsendothels (16) oder aufgrund von weiteren Ausschlusskriterien nicht für die Transplantation eingesetzt werden konnten.

Zu den weiteren Ausschlusskriterien zählen absolute und relative Kontraindikationen (siehe Anhang Tabelle 15, Seite 84), die in der Anamneseerhebung durch den behandelnden Arzt oder anhand der Patientenakte des Spenders erhoben werden (20).

Diese Hornhäute wurden zuvor innerhalb von 72 Stunden (17) nach Versterben des Spenders von qualifizierten Mitarbeitern der Hornhautbank Mainz als 14 mm Sclerocorneal-Ring (siehe Abb. 6, Seite 30) mittels aufgesetztem Handtrepan nach BEST entnommen und in die Mainzer Hornhautbank transportiert.

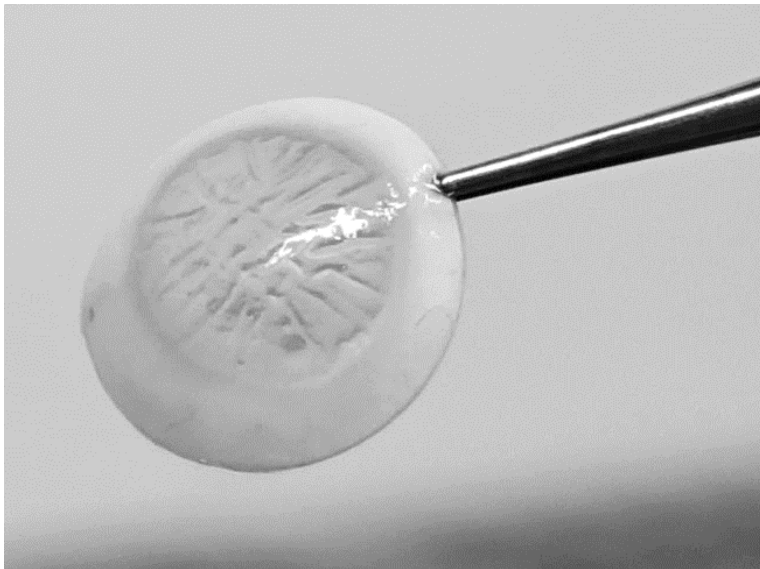


Abb. 6: Sclerocorneal-Ring. Fixiert mittels anatomischer Pinzette im Bereich der Sclera.

Dieser Transport erfolgte in Kulturmedium M2 (17) der Firma Biochrom GmbH (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, Culture Medium II, Art. Nr. F9017), welches zuvor mit fetalem, bovinen Serum (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, Fetal Bovine Serum, Art .Nr. S0413) angereichert und auf +2 bis +8°C (15) gekühlt wurde.

In der Hornhautbank wurden die entnommenen Hornhäute in eine 50 ml Kunststoff-Kulturflasche mit Schräghals (Konservierungsgefäß nach Böhnke (19)) der Firma Corning (Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland, Cell Culture Flask, Art. Nr. 353014) umgesetzt, die mit 40 ml Kulturmedium M1 der Firma Biochrom GmbH (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, Culture Medium I, Art. Nr. F9016) befüllt war. Hierzu wurden die Hornhäute auf einen Hornhauthalter der Firma Bausch+Lomb GmbH (Bausch+Lomb GmbH, Berlin, Deutschland, Donor Cornea Holder, Art. Nr. 93100S) gespannt.

Nach erfolgreicher Umsetzung und Kultivierung bei $34 \pm 1^\circ\text{C}$ für 3 bis 5 Tage erfolgte eine erste mikroskopische Untersuchung zur Beurteilung der Endothelzellichte der entnommenen Hornhäute durch die Mitarbeiter der Hornhautbank Mainz. Je nach Ergebnis dieser ersten orientierenden Endothelzellichten-Bestimmung konnten die entnommenen Transplantate z.T. nicht für die Verwendung am lebenden Patienten eingesetzt werden, sodass diese unter der Voraussetzung der Zustimmung des Verstorbenen bzw. seiner Angehörigen, für die Forschung freigegeben wurden.

3.2 Versuchsdurchführung

Mit diesen Hornhäuten wurden darauffolgend insgesamt zwei Versuchsreihen in M1- und M2-Medium (Versuchsreihe I und II) durchgeführt, bei denen jeweils 12 Hornhäute bzw. 6 Hornhautpaare untersucht wurden. Eine weitere Versuchsreihe mit zusätzlichen 12 Hornhäuten (Versuchsreihe III) erfolgte parallel zur Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels Dihydroethidium (DHE) - Färbung (siehe 3.2.4, Seite 39).

Kulturmedium M1 und M2 unterscheiden sich hauptsächlich in dem zu M2-Medium zugegebenen Dextran T500, welches dem Entquellen des Hornhautstromas dient und zur Vorbereitung der Hornhaut auf die Keratoplastik (16) zum Einsatz kommt. Alle anderen Inhaltsstoffe unterscheiden sich in M1-Medium und M2-Medium nicht nennenswert voneinander (siehe Anhang Tabelle 16, Seite 85).

Eine Übersicht über die beiden Versuchsreihen I und II liefert Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht der Versuchsreihen I und II.

	Versuchsreihe I	Versuchsreihe II
Medium	M2	M1
Ermittlung der initialen Endothelzelldichte nach Anzahl an Stunden nach Mediumwechsel zu Versuchsbeginn	24	0
Mikroskopier-Intervall	alle 3 Tage	alle 7 Tage
Anzahl Hornhäute Interventionsgruppe	6	6
Anzahl Hornhäute Kontrollgruppe	6	6

Die Durchführung beider Versuchsreihen erfolgte im sterilen Reinraum der Hornhautbank Mainz unter Verwendung von entsprechender Arbeitskleidung bestehend aus einem sterilen Kittel, unsterilen Handschuhen, unsteriler Haube und einem unsterilen Mundschutz. Alle Vorgänge, bei denen die Hornhäute aus ihrem Medium entnommen wurden, fanden an der Sterilbank des Reinraums statt, welche zuvor mit Desinfektionstüchern (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland, Schülke Wipes, Art. Nr. 119503) gereinigt wurde, die mit Terralinlösung (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland, terralin® protect, Art. Nr. 181610) getränkt waren. Bei allen Arbeiten an der Sterilbank wurden sterile Handschuhe getragen.

Das für die Versuchsreihen benötigte Medium und Serum wurde vor Versuchsbeginn dem Gefrierschrank entnommen und im Wasserbad auf 34 °C (16) erwärmt.

3.2.1 Versuchsreihe I

Für die Versuchsdurchführung der Versuchsreihe I wurden die dem Brutschrank entnommenen Hornhäute in ein Transportgefäß aus Glas (Zscheile & Klinger GmbH, Hamburg, Deutschland, Infusionsflasche nach DIN58 363/5, Art. Nr. 13005) überführt, welches zuvor mit 40 ml M2-Medium befüllt wurde. Letzteres erfolgte mithilfe einer batteriebetriebenen Pipettierhilfe der Firma Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland, pipetus®, Art. Nr. 9907200) und einer 25 ml Pipette der Firma Greiner Bio-One (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland, Pipette 25 ml, Art. Nr. 760180).

Dem Medium wurde im Vorfeld 1,6 ml, bzw. 0,8 ml je 40 ml Medium, fetales bovines Serum hinzugefügt, was einer Serumkonzentration von 2% im Kulturmedium entsprach. Dazu wurden 5 ml Pipetten der Firma Greiner Bio-One (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland, Pipette 5 ml, Art. Nr. 606180) verwendet.

Der Vorgang des Umsetzens ist in Abb. 7 dargestellt. Hierbei wurde der Hornhauthalter, welcher in Kulturflaschen mit Schräghals standardmäßig verwendet wird, nicht in die Glasgefäße mit überführt.



Abb. 7: Transfer eines Sclerocorneal-Rings vom Kunststoffgefäß mit M1-Medium in ein Glasgefäß mit M2-Medium.

Die Glasgefäße wurden anschließend durch Gummistopfen der Firma Zscheile & Klinger GmbH (Zscheile & Klinger GmbH, Hamburg, Deutschland, Brombutylstopfen, Art. Nr. 52213) auslaufsicher verschlossen, zurück in den Brutschrank transportiert und dort bei $34 \pm 1^\circ\text{C}$ einen Tag lang kultiviert.

Nach einer Entquellzeit von 24 Stunden wurden die Hornhäute erneut dem Brutschrank entnommen, zur Sterilbank des Reinraums transportiert und nacheinander mittels eines inversen Mikroskops Typ Nikon TE2000S (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland, TE2000S) mikroskopiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte bei 10-facher Vergrößerung.

Das für die mikroskopische Untersuchung verwendete Mikroskop ist in Abb. 8 dargestellt.



Abb. 8: Inverses Lichtmikroskop Typ Nikon TE2000S.

Hierfür wurde jede Hornhaut einzeln ihrem Glasgefäß entnommen und in je eine Vertiefung einer Kulturschale der Firma Corning (Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, USA, Falcon® 12-well Clear Multiwell Plate, Art. Nr. 353043) überführt. Jede Vertiefung wurde zuvor mit 3 ml BSS-Lösung (Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz, Deutschland, BSS-Lösung Hypoton), einer physiologischen Elektrolytlösung mit pH 7,5, mittels einer 10 ml Einmalspritze mit Luer-Ansatz der Firma B Braun (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Injekt® Luer-Solo, Art. Nr. 4606108V) und Standard-Einmalkanüle 20G der Firma B Braun (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Sterican®, Art. Nr. 4657519) befüllt.

Für die Endothelzellaufnahme am Computer wurde das Robin Endothelium Analyzer (REA) - System (Robin GmbH/Inc., Haan, Deutschland, REA Robin-Endothel-Analyzer 2.20) verwendet. Das System ermöglicht es, mikroskopierte Hornhautbilder als JPEG-Datei abzuspeichern und zu verwalten. Pro untersuchte Hornhaut wurden 5 Endothelzellaufnahmen angefertigt und auf dem Server der Hornhautbank Mainz gespeichert.

Nach erfolgter lichtmikroskopischer Untersuchung wurden die Hornhäute in der Kulturschale zurück zur Sterilbank transportiert, der Kulturschale entnommen, zurück in ihr Glasgefäß mit darin enthaltenem M2-Medium überführt und mit dem zugehörigen Gummistopfen verschlossen.

Anschließend wurden die Hornhäute per Zufallsprinzip entweder der Interventions- oder der Kontrollgruppe zugewiesen. Die Gruppenzuweisung wurde hierbei so gewählt, dass jedes Hornhautpaar bestehend aus einer linken und einer rechten Hornhaut, sowohl eine Hornhaut der Kontrollgruppe als auch eine der Interventionsgruppe aufwies.

Für die Interventionsgruppe ausgewählte Hornhäute wurden zum Schutz vor der potentiellen Entstehung von Glassplittern bei Verletzung des Gefäßes in einen 12 x 17 cm wiederverschließbaren Druckverschlussbeutel der Firma Anton Debatin GmbH (Anton Debatin GmbH, Bruchsal, Deutschland) verpackt und in dem oben beschriebenen 50 ml Glasgefäß der Firma Zscheile & Klinger GmbH, welches mit 40 ml Medium gefüllt war, aus 1,20 Meter auf PVC-Boden fallen gelassen, wobei es bei $n = 0$ Hornhäuten zu einem Defekt des Glasgefäßes kam.

Die Durchführung des Fallversuchs erfolgte im sterilen Reinraum der Hornhautbank Mainz an einer vorgesehenen Stelle, welche langfristig durch eine Markierung gekennzeichnet wurde.

Nach der Durchführung wurde die Zuweisung zur Interventions- und Kontrollgruppe im Laborprotokoll notiert und bis zum Abschluss der Ermittlung der Endothelzellichten sicher verwahrt, um eine Verblindung bei der Auswertung zu gewährleisten.

Bis zur nächsten mikroskopischen Untersuchung wurden die Hornhäute der Interventions- als auch der Kontrollgruppe im Brutschrank bei $34 \pm 1^\circ\text{C}$ weiter kultiviert.

In Versuchsreihe I wurde die Hornhautmikroskopie alle drei Tage wiederholt, bis das Abbruchkriterium einer Zellzahlabnahme von ≥ 75 Prozent der initial gemessenen Endothelzellzahl derselben Hornhaut erfüllt war. Danach wurde auch die kontralaterale Hornhaut nicht weiter mikroskopisch untersucht.

Dieses Abbruchkriterium wurde anhand einer Endothelzelldichte von gerundet 2000 bis 2500 CEC/mm² ermittelt, welche sich rechnerisch bei einem jährlichen Endothelzellverlust von 0,6 Prozent (4) und einer maximalen initialen Endothelzelldichte von 4000 CEC/mm² im Neugeborenenalter (19), bei gesunden

Erwachsenen zwischen dem 63. und 83. Lebensjahr findet. In der Hornhautbank Mainz betrug das durchschnittliche Spenderalter im Jahr 2018 72,22 Jahre (65), was aufgerundet dem Mittelwert der oben genannten Zeitspanne entspricht. Da ab einer Endothelzelldichte $< 500 \text{ CEC/mm}^2$ mit einem Hornhautödem und damit der Funktionslosigkeit der Endothelzellschicht zu rechnen sei (4), wurde diese Endothelzelldichte als unterer Grenzwert für die Ermittlung des Abbruchkriteriums gewählt. Bei einer initialen Endothelzelldichte von 2000 CEC/mm^2 entspräche dies einem Endothelzellverlust von 75 Prozent, welcher hier als Abbruchkriterium gewählt wurde, bei einer initialen Endothelzelldichte von 2500 CEC/mm^2 einem von 80 Prozent.

3.2.2 Versuchsreihe II

Versuchsreihe II wurde in Kulturmedium M1 durchgeführt und unterschied sich durch eine fehlende initiale Entquellzeit von 24 Stunden und einem abweichenden Mikroskopier-Intervall, welches im Vergleich zu Versuchsreihe I, 7 Tage betrug. Dieses längere Intervall wurde aufgrund des zu erwartenden wesentlich geringeren Endothelzellverlustes in M1-Medium im Vergleich zu M2-Medium und die damit verbundene zu erwartende längere Gesamt-Mikroskopierdauer gewählt (15, 66, 67). Diese Annahme stützt sich auf der Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank der Bundesärztekammer von 2018 (15), welche die maximale Kultivierungsdauer auf insgesamt 34 Tage festlegt, die Kultivierungsdauer in M2-Medium jedoch auf maximal 6 Tage beschränkt. Des Weiteren zeigte sich in Studien zur Organkultivierung von entnommenen Sclerocorneal-Ringen, dass der Zusatz von Dextran T500 mit einer zunehmenden Endothelzellschädigung assoziiert zu sein scheint (66, 67). Bei längerer Kultivierung komme es zur Ausbildung dextranhaltiger Vakuolen und einem intra- und extrazellulären Ödem, was den Zelluntergang fördere und die Qualität der Hornhaut verringere (66). Spelsberg, Reinhard et al. rieten überdies, die Verweildauer von Hornhauttransplantaten in dextranhaltigem Medium auf ein bis maximal zwei Tage zu beschränken (66). Um diesen rascheren Endothelzellverlust möglichst genau abzubilden, wurde in der vorliegenden Studie in Versuchsreihe I ein Mikroskopier-Intervall von 3 Tagen anstelle von 7 Tagen gewählt. Für die Versuchsreihe II schien ein 7-tägiges Mikroskopier-Intervall aufgrund des erwarteten geringeren Endothelzellverlustes ausreichend.

Aufgrund der fehlenden Entquellzeit wurde in Versuchsreihe II das Umsetzen der Hornhäute vom Kunststoff- in das Glasgefäß nicht unabhängig von der mikroskopischen Untersuchung durchgeführt, sondern erfolgte im selben Arbeitsschritt. Hierzu wurde das Glasgefäß analog zu Versuchsreihe I mit M1 befüllt, die Hornhaut jedoch bei Entnahme aus dem Kunststoffgefäß mit Schräghals nicht direkt in dieses überführt, sondern zuvor in eine vorbereitete Kulturschale der Firma Corning mit BSS-Lösung gegeben. Nach erfolgter mikroskopischer Untersuchung wurden die Hornhäute in das vorbereitete Glasgefäß mit M1 überführt, verschlossen und analog der Zuweisung zu Interventions- und Kontrollgruppe in Versuchsreihe I, fallen gelassen.

Alle nicht näher beschriebenen Arbeitsschritte waren mit denen der Versuchsreihe I identisch.

Bei allen Fallversuchen, sowohl der Versuchsreihe I als auch II, zeigte sich eine Schaumbildung des Mediums unmittelbar nach dem Versuch (siehe Abb. 9, Seite 37).



Abb. 9: Hornhäute desselben Spenders im Glasgefäß ohne und nach Intervention. In M1-Medium.
(links = Kontrolle, rechts = Intervention)

3.2.3 Ermittlung der Endothelzelldichte

Die Ermittlung der Endothelzelldichte erfolgte mittels des Programmes ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, ImageJ 1,51f) durch eine manuelle Auszählung des gesamten Bildausschnittes und einer anschließenden Umrechnung des Ergebnisses in Zellen pro mm^2 (CEC/ mm^2). Nach der Auszählung aller fünf Bilder pro Hornhaut pro Messtag wurde der Mittelwert gebildet und das Ergebnis in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) eingetragen.

In Abb. 10 ist beispielhaft die Endothelzellbestimmung einer Endothelzellaufnahme mittels ImageJ dargestellt.

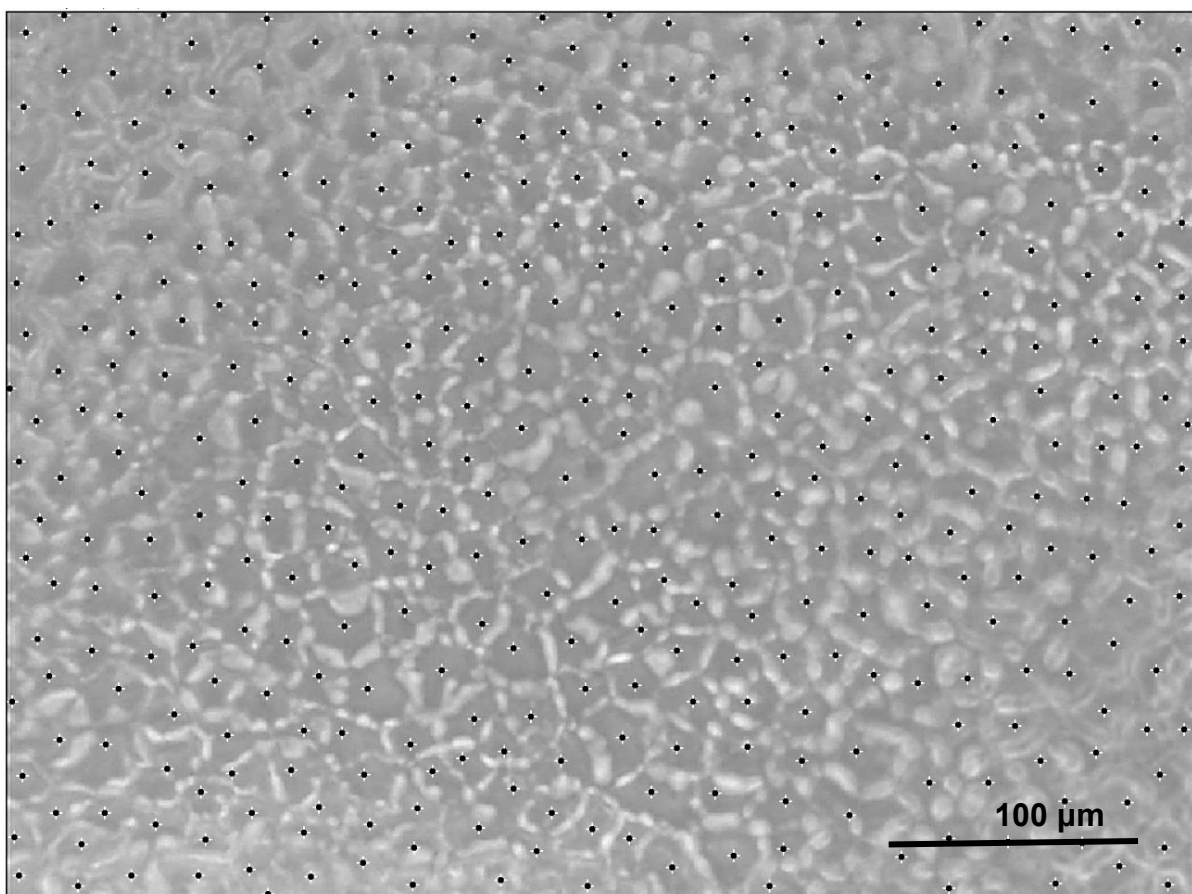


Abb. 10: Manuell ausgezählte mikroskopische Aufnahme des Hornhautendothels.

3.2.4 Versuchsreihe III - DHE-Färbung

In der Versuchsreihe III wurden weitere sechs Hornhautpaare, von denen sechs Hornhäute der Interventionsgruppe und sechs der Kontrollgruppe zugeordnet wurden, mittels DHE-Färbung untersucht.

Bei der DHE-Färbung handelt es sich um eine der häufigsten Färbungen zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffverbindungen und somit von oxidativem Stress. Dihydroethidium (5-ethyl-5,6-dihydro-6-phenyl-3,8-diaminophenanthridine (DHE), Hydroethidin (HE) (68)), dient hierbei als Fluoreszenzmarker für intrazelluläre Superoxide (69). Es handelt sich um eine hydrophobe ungeladene Verbindung, die extra- und intrazelluläre Membranen durchdringen (68, 70) und so von lebenden Zellen aufgenommen werden kann. Aus Dihydroethidium entsteht durch Oxidation Ethidium, welches sich im Zellkern anreichert, indem es mit den Nukleinsäuren der DNA interkaliert (70), sodass es mittels Fluoreszenzmikroskopie wahrgenommen werden kann (69).

Zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurden die Hornhäute 24 Stunden nach dem Stressexperiment in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert. Die DHE-Färbung erfolgte an Kryoschnitten der Hornhaut von 10 µm Dicke. Die Schnitte wurden mit DHE-Lösung (1 µm, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) beträufelt und in einer Feuchtkammer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Eclipse TS 100, Nikon, Yurakucho, Tokyo, Japan) und einer Kamera (DS – Fi1-U2, Nikon, Yurakucho, Tokyo, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 518 nm und einer Emissionswellenlänge von 605 nm Fotografien der Endothelzellschicht angefertigt. Im Anschluss wurde in den Fotografien die Leuchtdichte in der Endothelzellschicht mit Hilfe des Programms Image J bestimmt.

3.3 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS Version 23.0 für Microsoft Windows (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) und Microsoft Excel des Microsoft Office 356 ProPlus Pakets (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Die Daten des Kollektivs untersuchter Hornhäute wurden durch Beschreibung von Mittelwert, Median, Standardabweichung und Minimum sowie Maximum in Microsoft Excel ermittelt und dargestellt.

Anhand der Mittelwerte der einzelnen Messtage wurde mit Hilfe eines in Microsoft Excel erstellten Boxplots geprüft, ob die initiale Endothelzelldichte der untersuchten Hornhäute normalverteilt ist. Dieses Vorgehen ermöglichte es, einen geeigneten Test für den Vergleich der verbundenen Stichproben von Interventions- und Kontrollgruppe zu wählen und so die Hauptfragestellung der vorliegenden Studie zu beantworten.

Aufgrund dessen wurde für die weitere Auswertung der erhobenen Daten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test gewählt und die zuvor in Microsoft Excel eingetragenen absoluten Endothelzellzahlen in relative Werte umgerechnet und in SPSS übertragen. Bei den relativen Werten handelte es sich um den prozentualen Endothelzellverlust des jeweiligen Messtages verglichen zur initialen Endothelzelldichte derselben Hornhaut.

Bei der Durchführung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests wurde sich zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Hornhautpaare untereinander auf eine Analyse bis zu einem Messzeitpunkt beschränkt, an dem alle Hornhäute einer Versuchsreihe mikroskopiert und deren Dichte bestimmt wurde. Dies war sowohl in Versuchsreihe I als auch in Versuchsreihe II bis zu dem Messtag 21 der Fall, an welchem eines der sechs untersuchten Hornhautpaare beider Versuchsreihen das Abbruchkriterium erreichte und nachfolgend nicht weiter mikroskopisch untersucht wurde.

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Tabellen und Boxplots, die in Microsoft Excel erstellt wurden, grafisch dargestellt.

Zur Beantwortung der Nebenfragestellung wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen der initialen Endothelzelldichte, bzw. dem Endothelzellverlust und dem Alter des Spenders, der Post-Mortem-Zeit, der Lagerungsdauer, der Messdauer,

dem Geschlecht und der Endothelzelldichte zum Messende in Microsoft Excel berechnet und in Tabellen dargestellt.

Ebenfalls wurden zur Veranschaulichung aller bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums ermittelten absoluten Endothelzelldichten und dem relativen Endothelzellverlust bei Erreichen dieses Kriteriums mehrere Linien- und Balkendiagramme gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammensetzung des Kollektivs untersuchter Hornhäute

Die in der vorliegenden Studie in Versuchsreihe I und II verwendeten 24 Hornhäute wurden aufgrund von speziellen Ausschlusskriterien zur medizinischen Verwendung für die wissenschaftliche Forschung freigegeben. Ausschlusskriterien waren hierbei z.B. eine positive Serologie (siehe 3.1, Seite 30), eine zu geringe Endothelzellichte bei Primärbegutachtung, bestimmte Angaben im Anamnesebogen (siehe Anhang Tabelle 15, Seite 84) oder auch ein fehlender bzw. unvollständiger Anamnesebogen.

Das Durchschnittsalter der Spender untersuchter Hornhäute betrug in der Versuchsreihe I (M2) 76,2 (\pm 11,2) Jahre. Der Median lag bei 73,5 Jahren (Minimum 64 Jahre, Maximum 90 Jahre). In Versuchsreihe II (M1) ergab sich ein Mittelwert von 74,2 (\pm 9,97) Jahren und ein Median von 73,0 Jahren (Minimum 64, Maximum 90 Jahre). Bei Zusammenfassung von Versuchsreihe I und II zeigte sich ein Durchschnittsalter von 75,2 (\pm 10,2) Jahren und ein Median von 73,5 Jahren (Minimum 64 Jahre, Maximum 90 Jahre). Das durchschnittliche Spenderalter der untersuchten Hornhäute entsprach damit annähernd dem durchschnittlichen Spenderalter von 72,2 Jahren (2018) aller entnommener Hornhäute der Hornhautbank Mainz (65).

Die durchschnittliche Post-Mortem-Zeit bis zur Hornhautentnahme betrug in Versuchsreihe I (M2) 32,1 (\pm 19,8) Stunden, in Versuchsreihe II (M1) 35,2 (\pm 17,5) Stunden und insgesamt 33,6 (\pm 17,9) Stunden. Der Median lag in Versuchsreihe I bei 25,9 Stunden (Minimum 11,6 Stunden, Maximum 66,9 Stunden), in Versuchsreihe II bei 36,7 Stunden (Minimum 13,3 Stunden, Maximum 58,2 Stunden) und zusammen bei 28,1 Stunden (Minimum 11,6 Stunden, Maximum 66,9 Stunden).

Die Zeit zwischen Hornhautentnahme und Versuchsbeginn unterschied sich zwischen den Hornhautpaaren deutlich. In Versuchsreihe I (M2) betrug die durchschnittliche Lagerungsdauer 13,3 (\pm 8,49) Tage. Der Median lag bei 13,0 Tagen (Minimum 3 Tage, Maximum 29 Tage). In Versuchsreihe II (M1) betrug die durchschnittliche Lagerungsdauer 22,5 (\pm 16,8) Tage. Der Median lag bei 19,0 Tagen (Minimum 5 Tage, Maximum 49 Tage). Zusammenfassend ergab sich eine Durchschnittslagerungsdauer von 17,9 (\pm 14,1) Tage, der Median lag bei 14,5 Tagen (Minimum 3 Tage, Maximum 49 Tage).

Fünf Spender waren weiblich, sieben Spender waren männlich.

Die unmittelbar vor dem Versuch durchgeführte lichtmikroskopische Untersuchung ergab eine Durchschnittsendothelzelldichte von $1456 (\pm 537,1)$ CEC/mm². Der Median betrug $1328,5$ CEC/mm² (Minimum $419,4$ CEC/mm², Maximum $2539,4$ CEC/mm²), die Schiefe lag bei $0,313$, weswegen auf keine Normalverteilung geschlossen wurde (siehe Abb. 11, Seite 43). Aufgrund dessen wurde nachfolgend für die Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test gewählt, der bei zwei verbundenen Stichproben zum Einsatz kommt, sofern keine Normalverteilung vorliegt. Die durchschnittliche absolute initiale Endothelzelldichte aller 2018 entnommenen Hornhäute der Hornhautbank Mainz betrug 2101 CEC/mm² (65) und lag somit 645 CEC/mm² über der der vorliegenden Studie, was durch die Ausschlusskriterien und die davon abhängige Freigabe für die wissenschaftliche Forschung bedingt war.

Bei Trennung der beiden Versuchsreihen voneinander zeigte sich in Versuchsreihe I (M2) eine durchschnittliche absolute initiale Endothelzelldichte von $1357 (\pm 585,2)$ CEC/mm² bei einem Median von 1218 CEC/mm² (Minimum $419,4$ CEC/mm², Maximum $2254,6$ CEC/mm²). In Versuchsreihe II (M1) betrug diese $1554 (\pm 489,3)$ CEC/mm² bei einem Median von 1388 CEC/mm² (Minimum $1072,3$ CEC/mm², Maximum $2539,4$ CEC/mm²).

Eine Übersicht über die absolute initiale Endothelzelldichte der Hornhäute der Versuchsreihe I und II liefert Abb.11.

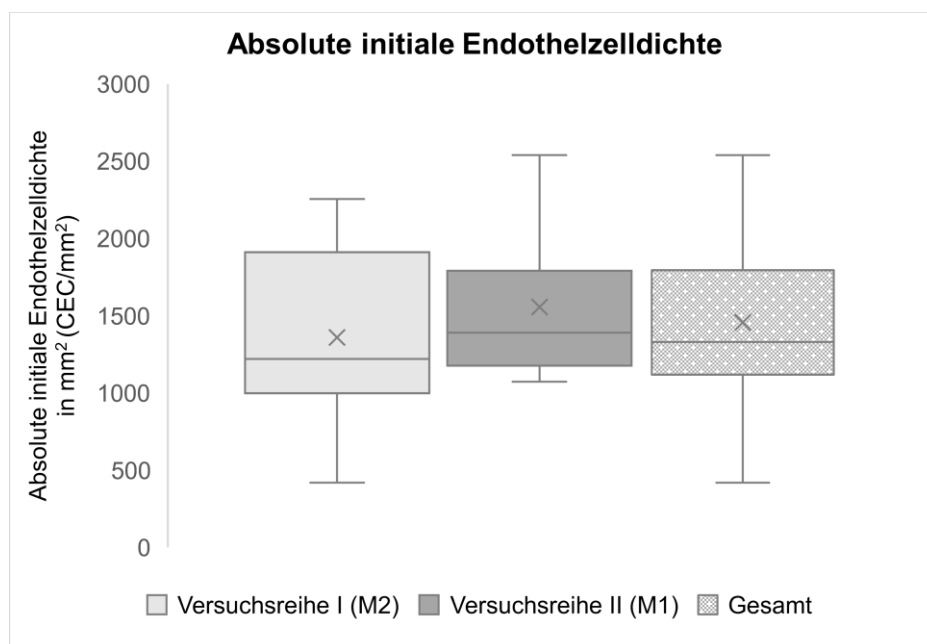


Abb. 11: Absolute initiale Endothelzelldichte untersuchter Hornhäute der Versuchsreihe I und II in mm² (CEC/mm²). Dargestellt als Boxplots mit Spannweite.

4.2 Höhe der physikalischen Parameter während des Fallversuchs

Zur Berechnung der Dauer des Fallversuchs und der Geschwindigkeit bei Aufprall des Gefäßes auf den Boden wurden physikalische Formeln verwendet, die im Folgenden weiter erläutert werden. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei den berechneten Größen um Näherungswerte handelt, welche beim realen Versuch stark von den tatsächlichen Werten abweichen können.

Zur Ermittlung der Dauer (t) des Fallversuchs wurde folgende Formel verwendet:

$$t = \sqrt{2h / g}$$

g = Erdbeschleunigung in m/s ²
h = Höhe in m

Daraus ergibt sich eine Dauer des Fallversuchs von 0,49 Sekunden, welche sich zur Berechnung der Geschwindigkeit (v) bei Aufprall des Gefäßes auf den PVC-Boden eignet. Diese wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$v = g * t$$

g = Erdbeschleunigung in m/s ²
t = Dauer des Fallversuchs in s

Die Geschwindigkeit beträgt somit 4,81 m/s.

Die Berechnung weiterer physikalischer Größen wie beispielsweise die Höhe der direkt auf das Hornhautendothel einwirkenden Kräfte und Drücke bedarf weitergehende Untersuchungen, da insbesondere die Art des Versuchsaufbaus und die damit verbundene individuelle Fall- und Aufprallweise jedes einzelnen Kulturgefäßes zur Entstehung unterschiedlicher Flüssigkeitsbewegungen und damit zu unterschiedlichen Scherkräften führt, welche dann auf die einzelne Hornhaut wirken. Hinzu kommt die Position jedes einzelnen Sclerocorneal-Rings im Kulturgefäß, welche zwischen den einzelnen Fallversuchen stark variieren kann. Dieser Versuchsaufbau schafft zum Einen besonders realitätsnahe Bedingungen, zum Anderen aber auch multifaktorielle Einflussgrößen auf die Höhe der tatsächlich entstandenen auf die Endothelzellschicht einwirkenden Kräfte, sodass eine Berechnung dieser in vorliegender Arbeit nicht realisierbar erscheint. Zur genauen Ermittlung dieser sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden.

4.3 Folgen des mechanischen Einflusses auf die Endothelzelldichte

Zum Vergleich des prozentualen Endothelzellverlustes in Interventions- und Kontrollgruppe wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei nicht parametrischen Stichproben durchgeführt. Hierbei wurde sich auf ein Messzeitraum von 21 Tagen beschränkt (siehe 3.3, Seite 40). In Versuchsreihe I (M2) wurden aufgrund des höheren Messintervalls 7 Messzeitpunkte miteinander verglichen, in Versuchsreihe II (M1) waren es hingegen durch die wöchentliche Messung nur 3 Messzeitpunkte.

Für die Auswertung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests wurde im Vorfeld ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt, wobei der ermittelte p-Wert mittels Bonferroni-Holm-Korrektur aufgrund der hohen Anzahl an Testwiederholungen korrigiert wurde. Hierbei zeigte sich keiner der sieben Messzeitpunkte als statistisch signifikant.

Der Median des prozentualen Endothelzellverlustes (ECL) der Interventions-, als auch der Kontrollgruppe, sowie die mittlere Differenz des prozentualen Endothelzellverlustes beider Gruppen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe I (M2) bis zum Messzeitpunkt Tag 21. Median des prozentualen ECL der Interventions (I) - und Kontrollgruppe (K) und mittlere Differenz des prozentualen ECL beider Gruppen.

	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
Median Interventionsgruppe	6,80	-0,56	12,82	5,30
Median Kontrollgruppe	-3,94	-3,14	-2,99	0,83
Mittlere Differenz (I-K)	6,71	3,17	6,69	1,90
p-Wert	0,116	0,600	0,345	0,917
Korrigierter p-Wert	0,928	3,000	2,070	1,834

	Tag 15	Tag 18	Tag 21
Median Interventionsgruppe	10,06	8,53	19,05
Median Kontrollgruppe	9,14	11,15	33,93
Mittlere Differenz (I-K)	0,13	-3,12	-18,11
p-Wert	0,753	0,600	0,173
Korrigierter p-Wert	2,259	2,400	1,211

Die Differenzen des mittleren relativen Endothelzellverlust zwischen Interventions- und Kontrollgruppe aller sieben Messzeitpunkte sind zudem in Form mehrerer Boxplots in Abb. 12 dargestellt. Anhand der Höhe und Lage der Boxplots wird deutlich, dass die Differenz des Endothelzellverlustes einen relativ konstanten Verlauf zu haben scheint und sich durch Zunahme der Messdauer nur wenig verändert. Eine Ausnahme bildet hier der siebte Messzeitpunkt (Tag 21), an welchem eines der sechs Hornhautpaare das Abbruchkriterium aufgrund eines erhöhten Endothelzellverlustes einer der beiden Hornhäute erreichte und aufgrund dessen die mittlere Differenz maßgeblich beeinflusste.

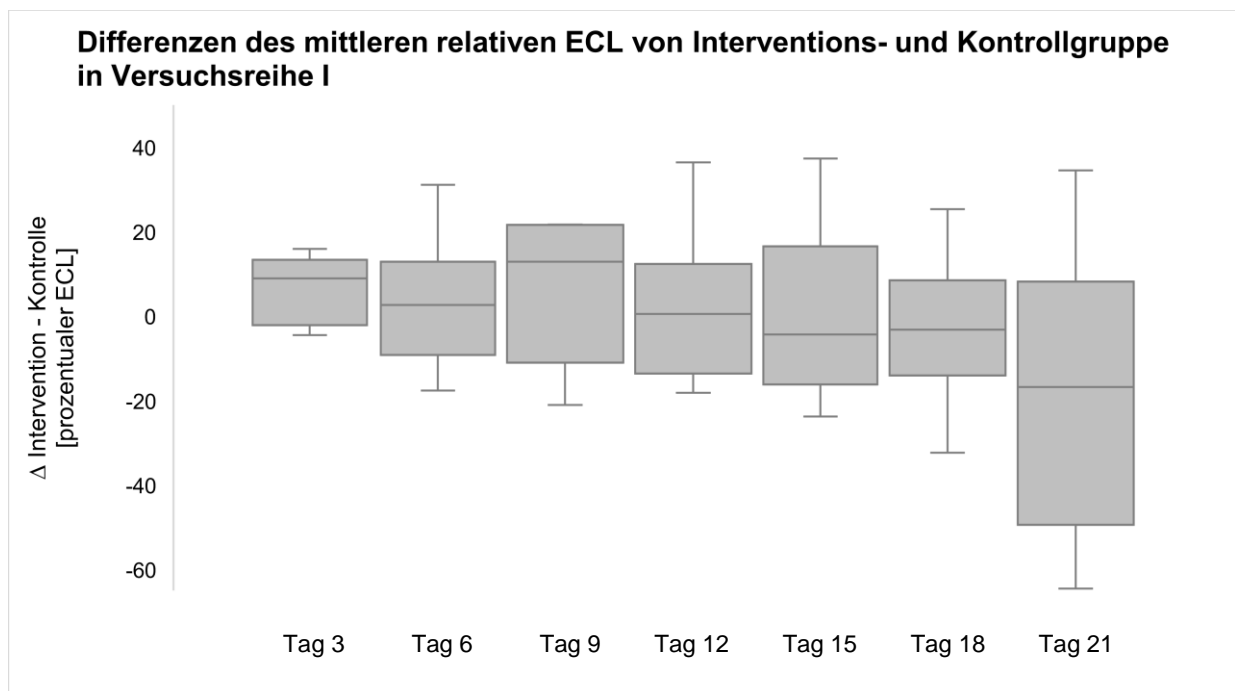


Abb. 12: Differenzen des mittleren relativen ECL zwischen Interventions- und Kontrollgruppe in Versuchsreihe I bis zum Messzeitpunkt Tag 21 [Δ Intervention – Kontrolle]. Dargestellt als Boxplots mit Spannweite.

Um zu ermitteln, ob eine längere Betrachtung der untersuchten Hornhautpaare andere Ergebnisse liefern würde, wurde das Hornhautpaar, das das Abbruchkriterium zuerst erreichte, in einer zusätzlichen Analyse mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgeschlossen. Dieses Vorgehen lieferte zwar auf der einen Seite einen zusätzlichen Vergleichswert, die Ergebnisse wurden hierdurch jedoch andererseits ungenauer. Die Auswertung des Messzeitpunktes Tag 24 zeigte, dass auch hier keine statistische Signifikanz vorlag.

Das Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe I bei Ausschluss des Hornhautpaares geringster Messdauer ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe I (M2) bei Ausschluss des Hornhautpaares geringster Messdauer.

	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
p-Wert	0,080	0,686	0,686	0,500

	Tag 15	Tag 18	Tag 21	Tag 24
p-Wert	0,893	0,893	0,345	0,225

Die Auswertung der Versuchsreihe II (M1) erfolgte analog der Auswertung der Versuchsreihe I (M2) mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Auch hier wurde im Vorfeld ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt, wobei der ermittelte p-Wert mittels Bonferroni-Holm-Korrektur korrigiert wurde. Auch in Versuchsreihe II (M1) zeigte sich keiner der drei untersuchten Messzeitpunkte als statistisch signifikant.

Der Median des prozentualen Endothelzellverlustes (ECL) der Interventions-, als auch der Kontrollgruppe, sowie die mittlere Differenz des prozentualen Endothelzellverlustes beider Gruppen ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe II (M1) bis zum Messzeitpunkt Tag 21. Median des prozentualen ECL der Interventions (I) - und Kontrollgruppe (K) und mittlere Differenz des prozentualen ECL beider Gruppen.

	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Median Interventionsgruppe	3,00	13,22	17,06
Median Kontrollgruppe	15,32	17,34	24,14
Mittlere Differenz (I-K)	-8,05	-2,48	-15,15
p-Wert	0,075	0,917	0,116
Korrigierter p-Wert	0,750	0,917	1,044

Die Differenzen des mittleren relativen Endothelzellverlustes zwischen Interventions- und Kontrollgruppe wurden zudem ebenfalls in Form dreier Boxplots getrennt nach Messzeitpunkt in Abb. 13 dargestellt. Auch hier zeigte der zuletzt analysierte

Messzeitpunkt am Tag 21 eine höhere mittlere relative Differenz des Endothelzellverlustes beider Gruppen, was auf das plötzliche Erreichen des Abbruchkriteriums einer Hornhaut eines der untersuchten Hornhautpaare zurückzuführen ist.

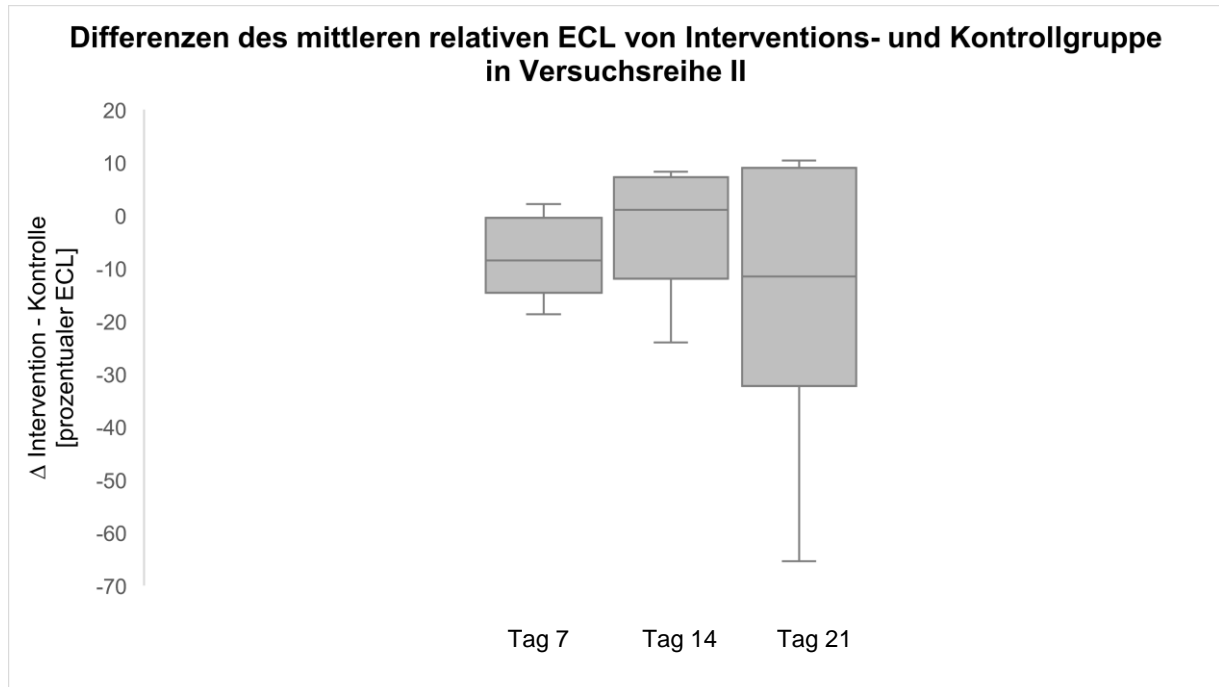


Abb. 13: Differenzen des mittleren relativen ECL zwischen Interventions- und Kontrollgruppe in Versuchsreihe II bis zum Messzeitpunkt Tag 21 [Δ Intervention – Kontrolle]. Dargestellt als Boxplots mit Spannweite.

Bei Ausschluss des Hornhautpaares mit der geringsten Messdauer von 21 Tagen konnten zwei weitere Messzeitpunkte ausgewertet werden. Die Auswertung der Messzeitpunkte Tag 28 und 35 zeigte, dass auch hier keine statistische Signifikanz vorlag (siehe Tabelle 11, Seite 49). Der prozentuale Endothelzellverlust der Kontrollgruppe lag jedoch zum Messzeitpunkt Tag 7, über dem der Interventionsgruppe ($p = 0,043$).

Tabelle 11: Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests in Versuchsreihe II (M1) bei Ausschluss des Hornhautpaares geringster Messdauer.

	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
p-Wert	0,043	0,500	0,225	0,893

	Tag 35
p-Wert	0,686

Auffallend war, dass es bis zum Messzeitpunkt Tag 21 in der Kontrollgruppe sowohl in Versuchsreihe I als auch Versuchsreihe II, zu einem tendenziell höheren prozentualen Endothelzellverlust verglichen zur Interventionsgruppe gekommen war (siehe Abb. 14, Seite 49).

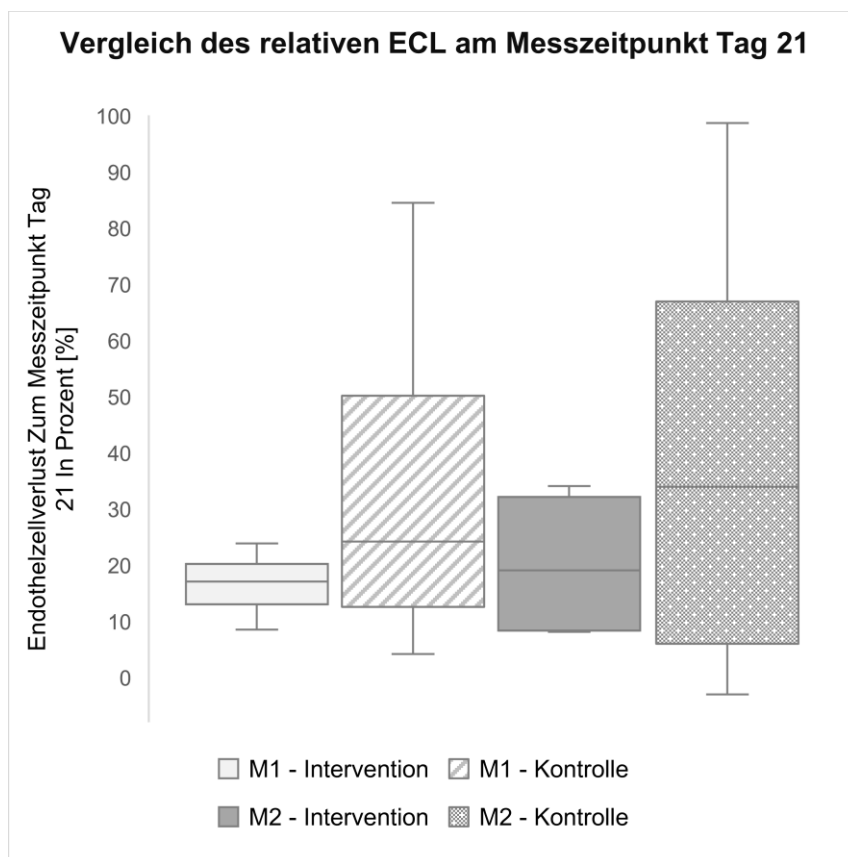


Abb. 14: Vergleich des Endothelzellverlustes (ECL) der Interventionsgruppe mit dem der Kontrollgruppe zum Messzeitpunkt Tag 21 aller untersuchten Hornhäute [in Prozent]. Dargestellt als Boxplots mit Spannweite.

4.4 Einfluss der Nebenkriterien auf die initiale Endothelzelldichte und den prozentualen Endothelzellverlust

Die im Folgenden als Nebenkriterien bezeichneten Kriterien „Alter des Spenders“, „Post-Mortem-Zeit“, „Lagerungsdauer“, „Messdauer“, „Endothelzelldichte zum Messende“ und „Geschlecht“ wurden auf ihre Einflussnahme auf die initiale Endothelzelldichte hin untersucht und werden nachfolgend unter Nennung ihrer Korrelationskoeffizienten nach Spearman dargestellt.

Bei Betrachtung der Endothelzelldichte bezogen auf das Spenderalter zeigte sich, dass 7 der 12 Spenderhornhäute mit einer initialen Endothelzelldichte $>1328,5$ CEC/mm² (Median) ein Spenderalter >74 Jahre (Median) und 5 Hornhäute ein Spenderalter <74 Jahre aufwiesen. Bei den Hornhäuten mit einer initialen Endothelzelldichte $<1328,5$ CEC/mm² stammten 5 von Spendern, welche >74 Jahre und 7 von welchen, die <74 Jahre alt waren. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,053$, was auf keine Korrelation zwischen initialer Endothelzelldichte und Spenderalter untersuchter Hornhäute hindeutet.

Auch der Vergleich der Zeit zwischen Tod des Spenders bis zur Entnahme der Hornhaut (Post-Mortem-Zeit) mit initialer Endothelzelldichte lieferte keine Korrelation ($r = -0,129$) (siehe Tabelle 12, Seite 51).

Beim Vergleich der Lagerungsdauer mit der initialen Endothelzelldichte zeigte sich, dass auch hier kein Zusammenhang zwischen Anzahl der gelagerten Tage und initialer Endothelzelldichte besteht.

Nach Bestimmung der initialen Endothelzelldichte und der Durchführung des Fallversuchs wurden die zu untersuchenden Spenderhornhäute je nach Versuchsreihe entweder alle drei, bzw. alle sieben Tage mikroskopiert und deren Endothelzelldichte bestimmt. Dies wurde so lange fortgeführt bis das Abbruchkriterium eines Endothelzelldichteverlustes von ≥ 75 Prozent der initialen Endothelzelldichte derselben Hornhaut erfüllt war. Die kontralaterale Hornhaut desselben Spenders wurde in diesem Fall ebenfalls nicht weiter mikroskopiert und ihre Endothelzelldichte bestimmt.

In Versuchsreihe I (M2) ergab sich durch dieses Vorgehen eine durchschnittliche Messdauer von $38,5 (\pm 21,4)$ Tagen bei einem Median von $30,0$ Tagen (Minimum 21 Tage, Maximum 81 Tage). In Versuchsreihe II (M1) waren es durchschnittlich $71,2 (\pm 46,5)$ Tage. Der Median betrug hier $59,5$ Tage (Minimum 21 Tage, Maximum 154

Tage). Zusammen betrug der Mittelwert der Messdauer 54,8 (\pm 39,2) Tage, der Median lag bei 40 Tagen (Minimum 21 Tage, Maximum 154 Tage). Der Korrelationskoeffizient zwischen Messdauer und initialer Endothelzelldichte der Hornhäute, die das Abbruchkriterium erreichten und so die Messdauer determinierten, lag bei $r = 0,485$, was auf einen deutlich positiven Zusammenhang hindeutet. Folglich erhöhte sich die Messdauer untersuchter Hornhäute mit initial höherer Endothelzelldichte. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung der Korrelation der initialen Endothelzelldichte in Bezug auf die Endothelzelldichte zum Messende untersuchter Hornhäute. Auch hier korrelierte eine hohe initiale Endothelzelldichte mit einer hohen Endothelzelldichte zum Messende.

Eine mäßige Korrelation zeigte sich zwischen initialer Endothelzelldichte und Geschlecht des Spenders. Männliche Spender zeigten in dem Kollektiv untersuchter Hornhäute geringfügig höhere initiale Endothelzelldichten als weibliche Spender, was sich in einem Korrelationskoeffizienten von $r = - 0,267$ widerspiegelte.

Eine Übersicht über die Korrelationskoeffizienten der initialen Endothelzelldichte liefert Tabelle 12:

Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten von initialer Endothelzelldichte verglichen mit den Nebenkriterien „Alter des Spenders“, „Post-Mortem-Zeit“, „Lagerungsdauer“, „Messdauer“, „Endothelzelldichte (ECD) zum Messende“ und „Geschlecht“.

	Initiale Endothelzelldichte
Alter des Spenders	$r = 0,053$
Post-Mortem-Zeit	$r = - 0,129$
Lagerungsdauer	$r = - 0,086$
Messdauer	$r = 0,485$
ECD zum Messende	$r = 0,491$
Geschlecht	$r = - 0,267$

Bei der Untersuchung des Einflusses einiger dieser Nebenkriterien auf den prozentualen Endothelzellverlust (ECL) untersuchter Hornhäute wurde sich ebenfalls auf den Messzeitpunkt Tag 21 beschränkt, da an diesem alle Hornhäute mikroskopiert und ihre Endothelzelldichte bestimmt wurde. Untersucht wurde hierbei die Einflussnahme der Kriterien „Alter des Spenders“, „Post-Mortem-Zeit“, „Lagerungsdauer“ und „Geschlecht“.

Eine Übersicht über die Korrelationskoeffizienten des Endothelzellverlustes liefert Tabelle 13:

Tabelle 13: Korrelationskoeffizienten von Endothelzellverlust in Prozent [%] zum Messzeitpunkt Tag 21 verglichen mit den Nebenkriterien „Alter des Spenders“, „Post-Mortem-Zeit“, „Lagerungsdauer“ und „Geschlecht“.

	Endothelzellverlust in Prozent [%] bis zum Messzeitpunkt Tag 21
Alter des Spenders	$r = 0,321$
Post-Mortem-Zeit	$r = - 0,249$
Lagerungsdauer	$r = - 0,131$
Geschlecht	$r = 0,337$

Während ein höherer prozentualer Endothelzellverlust mit einem höheren Spenderalter oder einem weiblichen Geschlecht assoziiert war, fand sich eine geringe bis mittlere Korrelation zwischen hohem Endothelzellverlust und niedriger Post-Mortem-Zeit. Lagerungsdauer und Endothelzellverlust korrelierten nicht miteinander.

4.5 Ergebnisse der Endothelzell-dichte-Bestimmung bis zum Messende

Die weitere Ergebnisdarstellung beschränkt sich auf die Betrachtung der Endothelzell-dichte bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums (AK) einer der beiden Hornhäute desselben Spenders, unabhängig der Messdauer, bzw. der Anzahl der Messzeitpunkte.

Abb. 15 und 16 zeigen den prozentualen Endothelzellverlust von Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe der jeweils sechs untersuchten Hornhautpaare in Versuchsreihe I und II zum Zeitpunkt des Erreichens des Abbruchkriteriums.

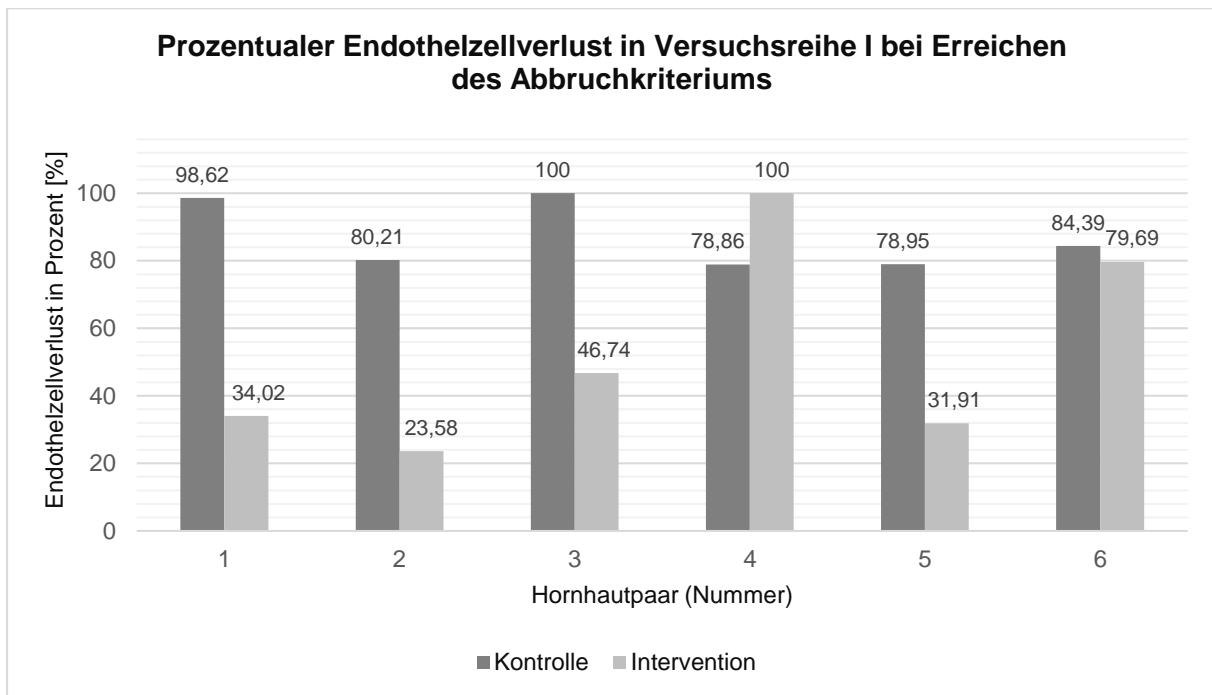


Abb. 15: Prozentualer Endothelzellverlust von Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe in Versuchsreihe I zum Zeitpunkt des Erreichens des Abbruchkriteriums. Dargestellt als Balkendiagramme.

Während in Versuchsreihe I (M2) das Abbruchkriterium von ≥ 75 Prozent der initial gemessenen Endothelzellzahl bzw. bei Erreichen beider Gruppen ein höherer Endothelzellverlust, in fünf der sechs Fälle durch die Kontrollgruppe erreicht wurde, waren es in Versuchsreihe II (M1) vier von sechs (siehe Abb. 16, Seite 54).

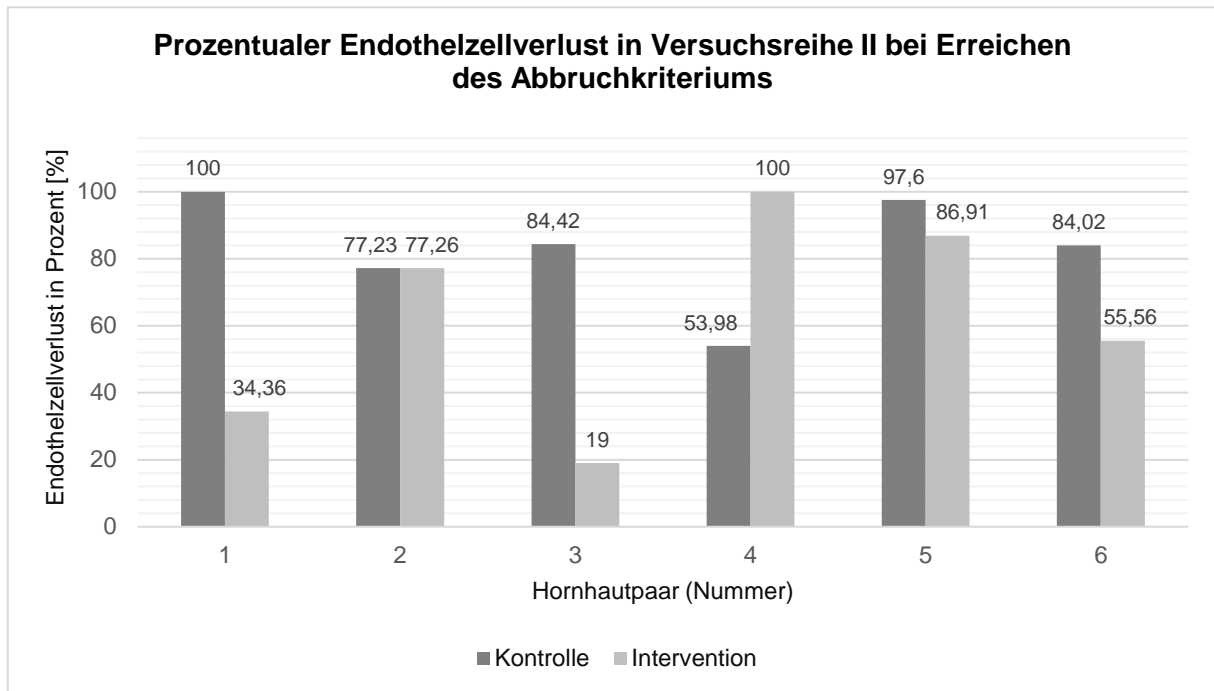


Abb. 16: Prozentualer Endothelzellverlust von Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe in Versuchsreihe II zum Zeitpunkt des Erreichens des Abbruchkriteriums. Dargestellt als Boxplots mit Spannweite. Dargestellt als Balkendiagramme.

Insgesamt erreichten 16 der 24 untersuchten Hornhäute in Versuchsreihe I und II das Abbruchkriterium, jeweils 8 pro Versuchsreihe. Weitere 8 Hornhäute, erreichten das Abbruchkriterium vor Messende nicht.

Die Anzahl der das Abbruchkriterium erreichenden Hornhäute sowie deren Zuordnung zur Interventions- und Kontrollgruppe ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Darstellung der Anzahl und der Zuordnung zur Interventions- und Kontrollgruppe der das Abbruchkriterium erreichenden Hornhäute.

	Anzahl ⁴	Interventionsgruppe ⁵	Kontrollgruppe ⁶
Versuchsreihe I	8/12	2/8	6/8
Versuchsreihe II	8/12	3/8	5/8
Insgesamt	16/24	5/16	11/16

4 Anzahl der das Abbruchkriterium erreichenden Hornhäute insgesamt

5 Anzahl der das Abbruchkriterium erreichenden und in der Interventionsgruppe befindlichen Hornhäute

6 Anzahl der das Abbruchkriterium erreichenden und in der Kontrollgruppe befindlichen Hornhäute

Die Verläufe der absoluten Endothelzellzahlen in mm^2 aller untersuchter Hornhautpaare in Versuchsreihe I (M2) und Versuchsreihe II (M1) von Messbeginn bis Erreichen des Abbruchkriteriums sind in Abb. 17 und 18 dargestellt.

Verlauf der absoluten Endothelzellichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe I

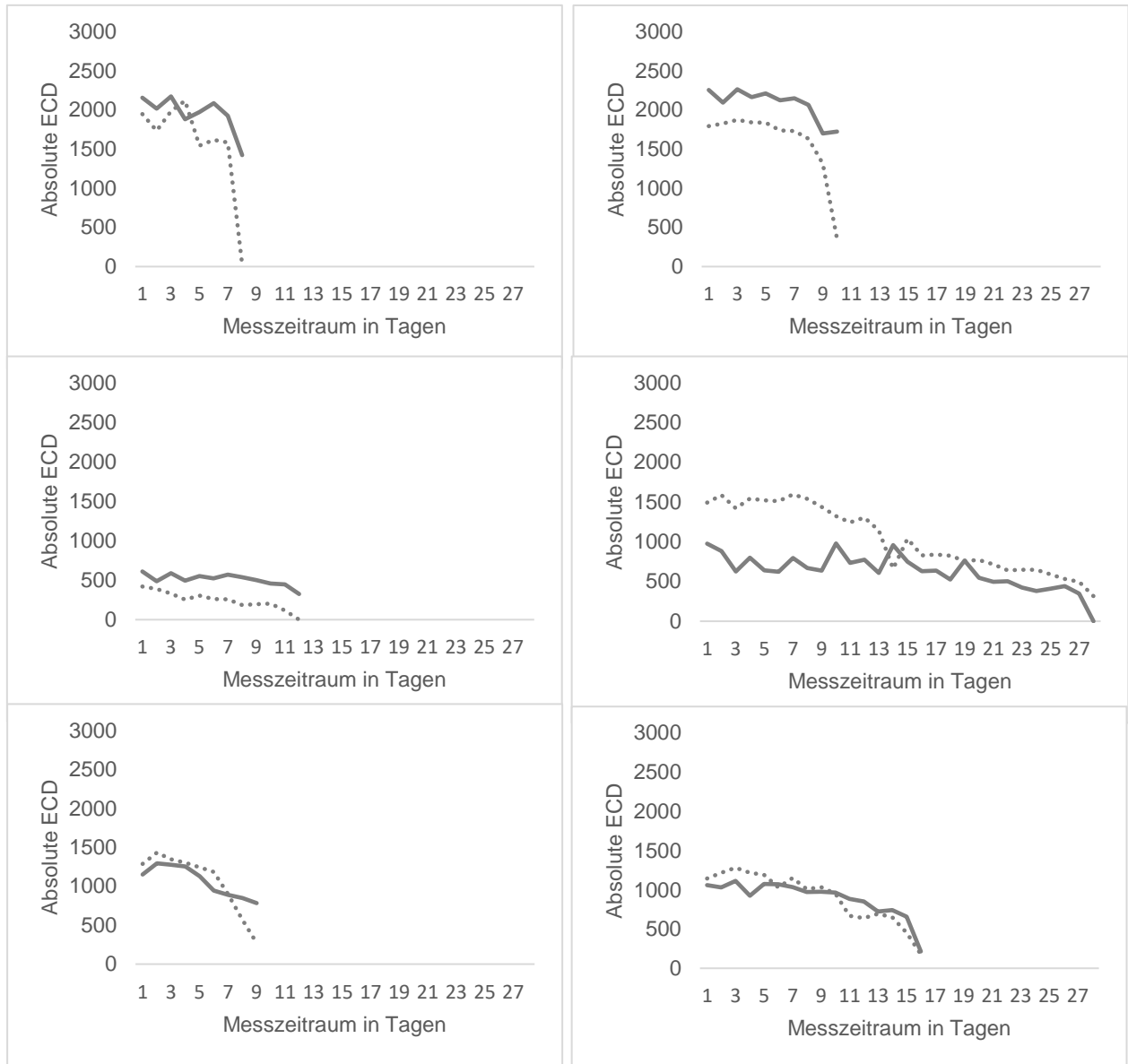


Abb. 17: Verlauf der absoluten Endothelzellichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe I (M2) in mm^2 [Intervention (durchgezogene Linie) und Kontrolle (gestrichelte Linie)]. Dargestellt als Liniendiagramme.

Während sich der Verlauf des Endothelzellichteabfalls in Versuchsreihe I (M2) bei drei der sechs Hornhautpaare ähnelte, variierte er bei drei weiteren Hornhautpaaren trotz initial recht ähnlichem Verlauf unmittelbar vor Erreichen des Abbruchkriteriums.

Diese Variation äußerte sich in einem unerwartet hohen Endothelzellverlust einer der beiden Hornhäute desselben Spenders.

In Versuchsreihe II (M1) zeigten ebenfalls drei der sechs Hornhautpaare einen ähnlichen Verlauf, wohingegen entweder Kontroll- oder Interventionsgruppe der drei weiteren Hornhautpaare trotz initial ähnlichem Verlauf einen unerwartet hohen Endothelzellabfall aufwies (siehe Abb. 18, Seite 56).

Verlauf der absoluten Endothelzellichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe II

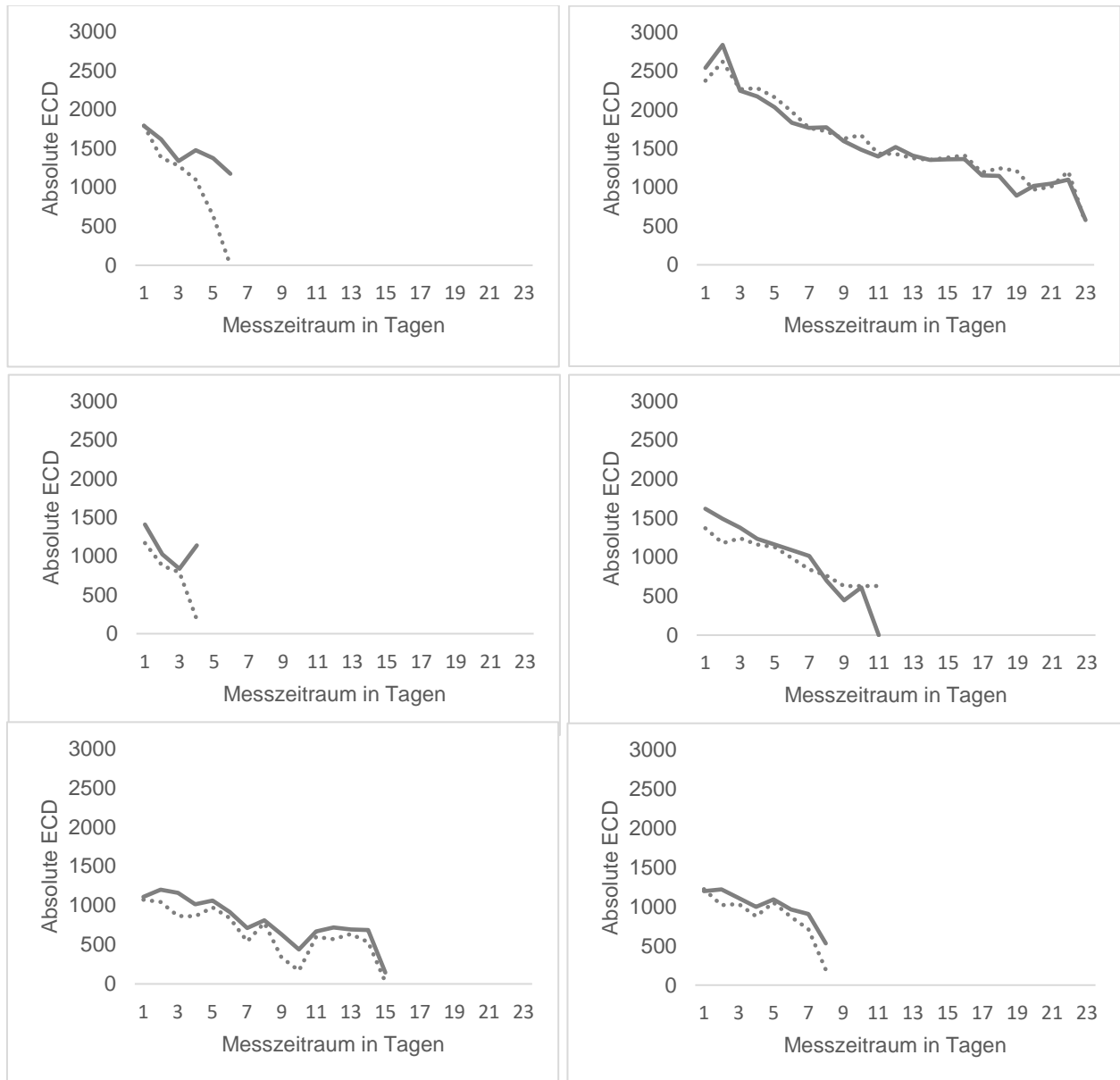


Abb. 18: Verlauf der absoluten Endothelzellichten der Hornhautpaare der Versuchsreihe II (M1) in mm² [Intervention (durchgezogene Linie) und Kontrolle (gestrichelte Linie)]. Dargestellt als Liniendiagramme.

Bei Zusammenfassung beider Versuchsreihen zeigte sich, dass eine Hälfte der untersuchten Hornhautpaare einen ähnlichen Verlauf von Interventions- und Kontrollgruppe aufwies, während es bei der anderen Hälfte der Hornhautpaare trotz ähnlichen initialen Verlaufs der absoluten Endothelzellzahlen zu einem unerwartet hohen Endothelzellverlust kam. Dieser zeigte sich in 83 Prozent der Fälle bei Hornhäuten der Kontrollgruppe und bei 17 Prozent bei denen der Interventionsgruppe.

Die durchschnittliche Differenz des prozentualen Endothelzellverlustes vom Zeitpunkt der vorletzten Messung bis zum Zeitpunkt der letzten Messung bei denen das Abbruchkriterium erreichenden Hornhäuten lag in der Versuchsreihe I (M2) bei 37,2 (\pm 21,4) Prozent. Der Median lag bei 31,7 Prozent (Minimum 12,1 Prozent, Maximum 79,9 Prozent). In Versuchsreihe II (M1) betrug der Mittelwert 39,0 (\pm 10,9) Prozent und der Median 40,1 Prozent (Minimum 20,5 Prozent, Maximum 52,2 Prozent). Dieser recht hohe prozentuale Endothelzellverlust zwischen der vorletzten und letzten Endothelzell-dichte-Messung ist vereinbar mit dem Ergebnis der Beobachtung der absoluten Endothelzell-dichten (siehe Abb. 17 und Abb. 18, Seite 55 und 56), bei der sich trotz initial ähnlichem Verlauf von Interventions- und Kontrollgruppe z.T. ein plötzlicher Endothelzellverlust zeigte, der zum Erreichen des Abbruchkriteriums der entsprechenden Hornhäute führte.

4.6 Ergebnisse der DHE-Färbung

Die Durchführung der DHE-Färbung ergab, dass Hornhäute der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen in der Endothelzellschicht aufwiesen.

Die relative Intensität der DHE-Fluoreszenz in der Endothelzellschicht ist in Abb. 19 dargestellt.

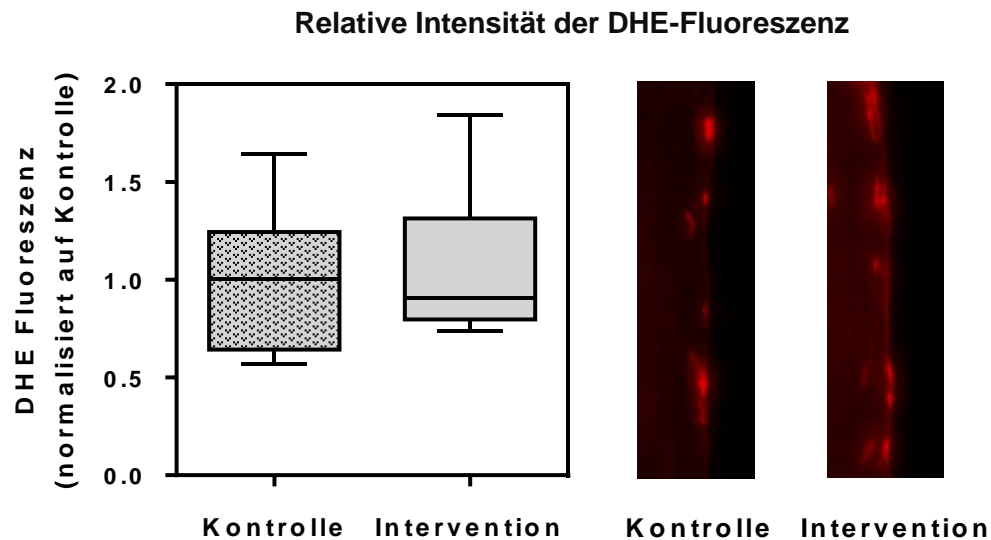


Abb. 19: Relative Intensität der DHE-Fluoreszenz in der Endothelzellschicht normalisiert auf die Kontrollgruppe. Dargestellt als Boxplots mit Spannweite.

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie wurden erstmals die Auswirkungen von starkem, einmaligem Gravitationsstress durch den Fall aus 1,20 Meter Höhe auf die Endothelzellviabilität organkultivierter Hornhäute untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass dieser Gravitationsstress keinen relevanten Einfluss auf die Endothelzellzahl und die Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen im Hornhautendothel hat. Weiter fand sich keine Korrelation von initialer Endothelzell-dichte mit dem Alter des Spenders, der Lagerungsdauer und der Post-Mortem-Zeit. Ein Zusammenhang zeigte sich lediglich zwischen initialer Endothelzell-dichte und Endothelzell-dichte zum Messende, einem männlichen Geschlecht, sowie zur Messdauer der entsprechenden Hornhaut insgesamt.

5.1 Diskussion der Methodik

Das in der vorliegenden Studie verwendete Untersuchungsmodell des Hornhauttransplantats findet Verwendung in zahlreichen Studien, die sich sowohl mit der Endothelzell-dichte als solches, als auch mit deren Einflussfaktoren beschäftigten.

5.1.1 Untersuchungsmodell menschliches Hornhauttransplantat

Die Verwendung menschlichen Spendergewebes ermöglicht es, einen unmittelbaren Vergleich zwischen für die Keratoplastik eingesetzten und die in der vorliegenden Studie verwendeten Hornhäuten zu ziehen. Sowohl die Aufbewahrung als auch die Erstellung mikroskopischer Aufnahmen der Sclerocorneal-Ringe fand analog zu den Abläufen der Mainzer Hornhautbank in denselben Räumlichkeiten und mithilfe derselben Gerätschaften statt. Ziel der Versuchsdurchführung war es, möglichst realitätsnahe Verhältnisse zu schaffen.

Die initiale Endothelzell-dichte der verwendeten Spenderhornhäute in der vorliegenden Studie war im Vergleich zu von der Hornhautbank Mainz für die Keratoplastik eingesetzten (65) und zu in anderen Studien verwendeten tierischen Sclerocorneal-Ringen (8) insgesamt geringer. Ein Endothelzellverlust noch vor Versuchsbeginn hatte somit bereits teilweise stattgefunden, was ebenfalls in anderen Studien thematisiert wurde (27). Die Qualität menschlicher Sclerocorneal-Ringe lag zudem unter denen tierischer Sclerocorneal-Ringe.

Dies ergab sich in erster Linie aus dem allgemeinen Bestreben, menschlich gespendetes, qualitativ hochwertiges Material, für die Verwendung am Menschen einzusetzen und lediglich Hornhäute zu verwerfen, die aufgrund des Erfüllens zuvor definierter Ausschlusskriterien (18, 20) nicht für den Einsatz am Patienten infrage kamen. Dadurch bedingt wurden unter anderem auch Hornhäute verwendet, die eine insgesamt geringere Ausgangsendothelzelldichte aufwiesen (16). Dennoch wurde bei der Auswahl der in der vorliegenden Studie verwendeten Hornhäute auf eine verwertbare Zelldichte geachtet.

In Nachfolgeuntersuchungen bietet es sich dennoch an, Untersuchungen mit menschlichen Hornhäuten höherer Endothelzellichten durchzuführen, indem beispielsweise lediglich Hornhäute mit positiver Serologie in Folgestudien eingeschlossen werden. Des Weiteren erscheint es sinnvoll, Unterschiede zwischen tierischen und menschlichen Sclerocorneal-Ringen in Bezug auf die Endothelzellschicht zu evaluieren.

Für eine initiale Beurteilung des Einflusses von Fallkräften auf die Endothelzellichten sind die Endothelzellichten der vorliegenden Studie jedoch ausreichend.

5.1.2 Versuchsdurchführung

Lagerungsbedingungen und Mediumwechsel

Die für die vorliegende Studie verwendeten Hornhäute wurden vor Versuchsbeginn im Brutschrank der Hornhautbank Mainz bei 34 ± 1 Grad °C in M1 gelagert, ohne dass eine regelmäßige Erneuerung des Mediums stattfand.

Diese erfolgt regelhaft bei einem initialen Volumen von 40 bis 60 ml Medium am 3. bis 10. Tag (15), um eine ausreichende Nährstoffzufuhr der Endothelzellen zu gewährleisten (71). Redbrake, Frantz et al. zeigten 1998, dass der Stoffwechsel der Hornhaut hauptsächlich auf dem Verbrauch von Glucose beruhe und die Abnahme von Glucose im Medium mit der metabolischen Aktivität der Hornhaut korreliere (71). Folglich führe eine zu geringe Glucosekonzentration im Medium zu einer Abnahme des Metabolismus und somit zu einem schlechteren Zustand der Endothelzellen noch vor Versuchsbeginn.

Hinzu kommt, dass es durch den fehlenden Mediumwechsel zu einer Abweichung des Versuchsablaufs von der Routinehandhabung menschlicher Hornhäute in der Hornhautbank kam.

Obwohl über die Hälfte der untersuchten Hornhäute keinen Mediumwechsel nach maximal 10 Tagen, sondern erst unmittelbar vor Versuchsbeginn erhielten, korrelierte die Dauer der Lagerung in demselben Medium und die initiale Endothelzelldichte nicht ($r = -0,086$). Studien anderer Autoren weisen jedoch auf eine solche Abhängigkeit hin (72, 73), weshalb die fehlende Korrelation der vorliegenden Studie als kritisch zu beurteilen gilt (siehe 5.2.3, Seite 69).

Abgesehen von diesem Mediumwechsel wurde das Medium nach der Durchführung des Fallversuchs bis zum Messende ebenfalls nicht erneuert, wie es im Regelfall bei einer Lagerung von für die Keratoplastik bestimmte Hornhäute notwendig gewesen wäre (15). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die auf die Hornhäute einwirkenden, von dem Fallversuch unabhängigen Stressfaktoren größtmöglich zu reduzieren.

Aufgrund des sich mit der Zeit reduzierenden Nährstoffgehalts des Mediums (71), wurde dieses in der Kontrollgruppe ebenfalls nicht erneuert, um vergleichbare Bedingungen von Interventions- und Kontrollgruppe zu gewährleisten.

Trotz der fehlenden Korrelation sollte aufgrund der geringen Fallzahl der vorliegenden Studie dennoch der Einfluss der Lagerungsdauer bei zukünftigen Untersuchungen in Betracht gezogen und ein Mediumwechsel im angegebenen Zeitfenster für genauere Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt werden.

Kultivierungsdauer

Der in der vorliegenden Studie verwendete Versuchsablauf beruhte auf einer mikroskopischen Ermittlung der Endothelzelldichte untersuchter Hornhäute über einen Zeitraum der normalen Kultivierung in einer Hornhautbank hinaus. Während 34 Tage als Höchstdauer in M1 und 6 Tage in M2 (15, 16) gelten, überschritt die Kultivierungsdauer bis auf einen Fall diese Dauer zum Teil erheblich.

Dieses Vorgehen wurde gewählt, um langfristige Auswirkungen von Gravitation und Fallkraft zu ermitteln, die im normalen „Klinikalltag“ aufgrund frühzeitiger Verwendung der Hornhäute nicht erhoben werden. Nach Keratoplastik auftretende Endothelzellabfälle lassen sich im Nachhinein nicht mehr einem mechanischen Trauma noch während der Lagerung, des Transports, der Operation oder postoperativ zuordnen (26). Während Ramirez-Garcia, Khalifa et al. einen deutlich erhöhten Endothelzellverlust nach der Transplantation beschrieben (26), sahen Hagenah, Carstens et al. bislang keine Erklärung für diesen langfristigen Verlust (74).

Eine langfristige Ermittlung der Endothelzelldichte über das vorgeschriebene Maß von 34 Tagen hinaus war somit in der vorliegenden Studie unabdingbar, um eine Erklärung für den Endothelzellverlust zu finden, bzw. diesen auszuschließen.

Standardisierung des Fallversuchs und Verwendung von Glasgefäßen in beiden Versuchsreihen

Anstatt eines standardisierten Versuchsmodells wurde ein halb-standardisiertes Versuchsdesign gewählt, bei dem Räumlichkeiten und Versuchsabfolgen standardisiert (16), der Fallversuch als solches jedoch nicht standardisiert war. Diese Verfahrensweise erschien in der vorliegenden Studie sinnvoll, um realitätsnahe Bedingungen zu schaffen, wie sie bei einem Zwischenfall im Labor vorkommen könnten. Chapanis Beschreibungen 1967 zu standardisierten Messmethoden bei Laborexperimenten stützt im vorliegenden Fall die angewandte Verfahrensweise. Laut seiner Aussage seien die im Labor angewandten Methoden zur Darstellung von Variablen in einigen Fällen künstlich und unrealistisch (75). Auch Winkler und Murphy sprechen sich für realitätsnähere Experimente aus (76).

Während Rosenbaum, Reinhard et al. in ihrer Untersuchung zum Einfluss von Fallkräften eine standardisierte Blechröhre unbekannter Höhe verwendeten, um für alle Hornhäute identische Fallbedingungen zu gewährleisten (53), entschied sich die vorliegende Studie gezielt gegen den Einsatz eines den Fall standardisierenden Objekts. Vielmehr wurde eine Situation simuliert, wie sie unter realen Bedingungen auftreten kann.

Des Weiteren wich der Versuchsablauf der Versuchsreihe II (M1) durch die Verwendung eines Glasgefäßes von den standardmäßigen Verfahren der Hornhautbank Mainz ab, die Glasgefäße ausschließlich mit M2 befüllen (16). Zwischenfälle, bei denen es somit zu einem Fall eines Glasgefäßes mit sich darin befindlicher Hornhaut in M1 kommt, sind somit in der Hornhautbank Mainz realitätsfern.

Dennoch wurde in der vorliegenden Studie dieses Verfahren gewählt, um zum einen eine Vergleichbarkeit zwischen Versuchsreihe I und Versuchsreihe II zu schaffen, zum anderen, um die Intaktheit des Gefäßes nach dem Fallversuch zu gewährleisten. Während die Möglichkeit einer Schadennahme durch den Fallversuch des Kunststoffgefäßes im Vergleich zum Glasgefäß als höher zu beurteilen war, bestand zudem die Gefahr des HerauslöSENS der Hornhaut aus dem Hornhauthalter (siehe

Abb. 7, Seite 33). Ein erneutes Fixieren im Hornhauthalter konnte in diesem Fall mit einer zusätzlichen Belastung der Hornhaut assoziiert sein, die in der Kontrollgruppe nicht auftreten würde.

Des Weiteren orientieren sich deutsche Hornhautbanken an selbst erstellten Verfahrensanweisungen auf Grundlage der „Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank“, welche regelmäßig von der Bundesärztekammer herausgegeben und erneuert wird (15). Diese sieht die Organkultivierung in einem geeigneten Entquellungs-/Transportmedium in einem geschlossenen System vor, spezifiziert die genaue Art dieses Systems jedoch nicht. Je nach Hornhautbank ist somit die Verwendung von Glasgefäßen für Kulturmedium M1 somit denkbar.

Um den Einfluss von Fallkräften auf sich im Kunststoffgefäß befindliche, im Hornhauthalter eingespannte Hornhäute zu ermitteln, erscheint es für Nachfolgeuntersuchungen sinnvoll, in einem ähnlichen Versuchsaufbau eben diesen unabhängig der vorliegenden Studie zu untersuchen.

Individuelle Messdauer

Das in der vorliegenden Studie verwendete Abbruchkriterium von ≥ 75 Prozent wurde gewählt, um die Messdauer auf ein gewisses Zeitmaß zu beschränken und eine Vergleichbarkeit aller untersuchter Hornhäute herzustellen. Vorteil dieses Vorgehens war, dass sowohl Interventions- als auch Kontrollgruppe desselben Spenders über einen identischen Zeitraum nachverfolgt werden konnten. Innerhalb dieses Zeitraumes ermöglichte dieses Vorgehen einen individuellen Vergleich beider Gruppen miteinander. Bei hoher initialer Endothelzelldichte lag die individuelle Messdauer teilweise erheblich über der durchschnittlichen Messdauer von 54,8 ($\pm 39,2$) Tagen (siehe 4.4, Seite 50), was zu einer höheren Anzahl von Messergebnissen führte.

Durch die unterschiedliche Messdauer der einzelnen Hornhautpaare gestaltete sich die statistische Auswertung jedoch als problematisch, weshalb auf den letzten Zeitpunkt zurückgegriffen wurde, an dem die Endothelzelldichte aller untersuchter Hornhautpaare bestimmt wurde. Die kontinuierliche Messung derjenigen Hornhautpaare, die das Abbruchkriterium nach einer insgesamt längeren Messdauer erreichten, ermöglichte es jedoch, den langfristigen Verlauf der Endothelzelldichte zu beobachten.

Insgesamt empfiehlt es sich, um bei nachfolgenden Studien eine höhere vergleichbare Datenmenge zu erhalten, die zu untersuchenden Hornhäute über einen identisch langen Zeitraum nachzuverfolgen. Um jedoch langfristige Folgen zu analysieren, die möglicherweise bei der Festlegung eines solchen Zeitraumes entfallen, wurde ein solches Vorgehen in der vorliegenden Studie bewusst nicht gewählt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigten, dass Fallkräfte, denen organkultivierte Hornhäute in Form von Gravitation aus 1,20 m Höhe ausgesetzt sind, auch langfristig zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Endothelzelldichte führen und somit nicht als Ursache für eine verminderte Transplantatqualität zu werten sind.

Dies stützt die Hypothese, dass physikalische Kräfte, die auf Transportwegen, im Labor während des Mediumwechsels oder unmittelbar vor der Operation entstehen können, die Endothelzelldichte und -vitalität schädigen, nicht.

Die Betrachtung des Verlaufs der Endothelzelldichte ergab, dass bei initial höherer Endothelzelldichte die Messdauer und auch die Endothelzelldichte zum Messende vergleichsweise höher war als bei Hornhäuten niedrigerer initialer Endothelzelldichte. Während Spenderhornhäute männlichen Geschlechts größere initiale Endothelzelldichten aufwiesen, zeigten Hornhäute von Spendern weiblichen Geschlechts einen höheren Endothelzellverlust. Auch höheres Spenderalter und niedrige Post-Mortem-Zeit korrelierten mit einem höheren Endothelzellverlust.

Auffallend war zudem, dass 50 Prozent der untersuchten Hornhäute einen recht ähnlichen Verlauf absoluter Endothelzellzahlen bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums aufwiesen, es jedoch bei den anderen 50 Prozent trotz initial ähnlichem Verlauf zu einem plötzlichen Zelluntergang einer der beiden Hornhäute kam. Während dies in 17 Prozent der Fälle durch eine Hornhaut der Interventionsgruppe geschah, war es in 83 Prozent der Fälle die der Kontrollgruppe.

5.2.1 Fallkräfte

Dass die auftretenden Fallkräfte nicht im Zusammenhang mit einer Erhöhung des Endothelzellverlustes stehen, bestätigen die Ergebnisse von Rosenbaum, Reinhard et

al., die Erschütterungen von mindestens 100g auf sich im Styroporgefäß befindliche Hornhäute als unbedenklich einstufen (53). Während sich diese auf den Transport von in M2 befindliche, ordnungsgemäß verpackte Hornhäute konzentrierten, beschäftigte sich die vorliegende Studie vor allem mit Fallkräften, die bei einem direkten Aufprall des Glasgefäßes mit darin befindlicher Hornhaut und Medium aus 1,20 m Höhe entstehen können.

Sowohl der Sturz einer styroporverpackten als auch der einer unverpackten Hornhaut scheint demzufolge keinen negativen Einfluss auf die Endothelzellschicht einer organkultivierten Hornhaut zu haben, da die Kraft, die dabei auf die Hornhaut wirkt, nicht groß genug sei.

Diese Annahme stützen Untersuchungen von Ramirez-Garcia, Khalifa et al., die zeigten, dass bloßer Kontakt der Epithelzellseite organkultivierter Hornhäute zu keinem unmittelbaren Endothelzellverlust führt, sondern hierfür Drücke, bzw. Krafteinwirkungen von mehr als 5,7 kPa, insbesondere >10,25 kPa notwendig sind (26). Da die vorliegende Studie keinen statistisch signifikanten Unterschied des Endothelzellverlustes der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrolle nachweisen konnte, scheint es bei dem durchgeführten Fallversuch ebenfalls nicht zu endothelzellschädigenden Drücken oder Scherkräften zu kommen.

Solche Drücke entstünden vielmehr durch den Aufprall des Auges auf einen geöffneten Airbag (54–56), erhöhten intraokulärem Druck (8, 57–59) oder intraokuläre Luftblasen (60), was in einigen Studien genauer untersucht und mit einem Endothelzellverlust in Verbindung gebracht wurde (siehe 2.3, Seite 19).

Während der Druck, der bei einem Anprall auf einen Airbag auf das entsprechende Körperteil mit ± 60 kPa wirkt (77) und mit langfristigen Endothelzellschäden der Hornhaut assoziiert zu sein scheint (54–56), liegt der physiologische Augeninnendruck bei 11 bis 21 mmHg, was 1,5 bis 2,8 kPa entspricht (4). Erhöhte intraokuläre Drücke in Höhe von ± 82 mmHg bzw. 11 kPa, wie sie in Studien von Li, Zhang et al. untersucht wurden, zeigten, dass auch hier bei erhöhten Druckwerten mit einem Endothelzellverlust und morphologischen und funktionellen Schäden der Endothelzelle zu rechnen sei (8).

5.2.2 Oxidativer Stress

Derartige mechanisch bedingte Zellschäden seien vermutlich zudem in anderen Körperzellen mit einer Zunahme reaktiver Sauerstoffverbindungen, sogenannter ROS, assoziiert (78–83).

So beschäftigte sich Lehoux 2006 (78) mit dem Einfluss von Scherkraft auf die Endothelzellschicht von Blutgefäßen. Besonders bei Veränderungen des Blutdrucks und des Blutflusses komme es zu einer erhöhten Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen, was pathologische Gefäßveränderungen begünstige. Ein kontinuierlicher druckkonstanter Blutfluss sei andererseits essenziell für die Vitalität der Endothelzellen des Gefäßes.

Während oszillierende Scherkräfte in kultivierten Endothelzellen zu einer erhöhten Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) - Expression von NOX2- und NOX4-Untereinheiten der NADPH-Oxidase führten, komme es bei einer länger anhaltenden, laminaren Strömungszunahme wieder zu einer Reduktion der anfänglich erhöhten ROS-Produktion. Dies könnte als Schutzfunktion des Gefäßes bei chronischer Belastung durch Scherkräfte verstanden werden, so Lehoux. Denn mechanischer Stress beeinflusse auch antioxidative Stoffwechselwege. Bei akuter Zunahme der Scherkräfte komme es neben der Menge an NADPH-Oxidase ebenfalls zu einer Erhöhung der mRNA- und/oder Protein-Menge von Thioredoxin-1, einem antioxidativem Protein und Hämoxxygenase-1, einem antioxidativen Enzym, was die Menge an ROS in den Endothelzellen reduziere, bzw. deren Zunahme entgegenwirke. Des Weiteren führe die Induktion von Enzymen wie der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase auch bei länger anhaltenden Veränderungen des Blutflusses zum Schutz der Endothelzellschicht vor ROS.

Auch bei erhöhten intraluminalen Blutdrücken steige die Produktion von Superoxid-Ionen, aber auch gleichzeitig die Aktivität der Superoxid-Dismutase und der Katalase (78).

Neben den Endothelzellen von Gefäßen fanden sich noch weitere Körperzellen, die mit der Freisetzung von ROS auf mechanischen Stress reagierten.

So zeigte sich beispielsweise in kardialen Myozyten oder quergestreifter Skelettmuskulatur nach übermäßiger Dehnung oder kontraktile Aktivität eine Zunahme der Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen (81, 83). Im Herzen sei

vermutlich ein möglicher Mechanismus hierbei die Stimulierung der AT₁ (Angiotensin 1) -Rezeptoren durch die genannten mechanischen Kräfte, so Shimosawa 2006 (81). Wie auch Lehoux nennen Ward, Prosser et al. 2014 das Transmembranprotein NOX2 der NADPH-Oxidase als Hauptquelle für ROS, insbesondere bei der Kontraktion quergestreifter Skelettmuskulatur (83). Hierbei fungiere das Netzwerk der Mikrotubuli als Element der Mechanotransduktion, das ROS-abhängiges NOX2 während mechanischer Dehnung aktiviere. Ward, Prosser et al. bezeichneten dies als X-ROS-Weg (83).

Während eine dauerhafte Kontraktion der kardialen und skelettalen Myozyten nur wenig zu einer Zunahme der ROS-Synthese beitrage, führe eine kurzfristige oder repetitive Zunahme mechanischen Stresses, analog zu dem Auftreten akuter Scherkräfte in Gefäßen, im Gegensatz dazu, sehr stark zu einer solchen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Chapman, Sinclair et al. 2005 (80), die sich mit den Folgen zyklischer mechanischer Dehnung von Lungenepithelzellen beschäftigten. Hierfür untersuchten sie immortalisierte humane Lungenepithelzellen als auch menschliche und von Ratten stammende Pneumozyten Typ II. Hierbei zeigte sich in allen drei Zellreihen durch den Einfluss zyklischen mechanischen Stresses eine Zunahme der Superoxid-Ionen, wenn dieser mindestens 2 Stunden bestand. Das Maximum der ROS-Freisetzung erreichten die Zellen nach 6 Stunden. Gleichzeitig verlagere sich das Gleichgewicht von reduzierten zu oxidiertem Glutathion auf die Seite der oxidierten Form, was das Vorhandensein oxidativen Stresses bestätige. Während sich die ROS-Produktion nach 24 Stunden wieder normalisiert hatte, blieb das reduzierte Glutathion weiterhin verringert.

Voraussetzung für die Bildung von ROS sei jedoch eine Dehnung der Zellen von mindestens 15%. Die entstehenden reaktiven Sauerstoffverbindungen würden zur mechanisch bedingten Entzündung des Lungengewebes mit einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und der Einschwemmung von Neutrophilen Granulozyten ins Gewebe führen, so Chapman, Sinclair et al. Eine aus der Entzündung entstehende langfristige Schädigung des Gewebes durch die mechanische Beeinflussung sei die Folge.

Auch Hu, Hong et al. zeigten 2017 anhand von Fibroblasten aus dem Bandapparat des Uterus, dass kurzfristige mechanische Dehnung mit einer Reduktion der

Proliferationsrate und einer Erhöhung der Zellseneszenz, also der Zellteilungspause, assoziiert sei (79).

In einem Zeitraum von vier Stunden komme es bei zunehmender Dehnung zur Vakuolisierung der Mitochondrien und zur Schädigung des bestehenden Zytoskeletts, was das Überleben der uterinen Fibroblasten reduziere und einen Prolaps begünstige. Hinzu komme, dass die Expressionsrate antioxidativer Enzyme in Geweben von Patienten mit Prolaps insgesamt reduziert sei, die Menge von reaktiven Sauerstoffverbindungen bei mechanischer Belastung jedoch gleichzeitig steige.

Auch in retinalen Pigmentepithelzellen führe eine zyklische Dehnung zu einer Zunahme der ROS-Produktion und erhöhe dadurch die Auftretenswahrscheinlichkeit und Progression einer altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) (82).

Laut Liang, Wang et al. führe eine übermäßige Adhäsion von Glaskörper und retinaler Oberfläche zu einer chronischen und kontinuierlichen Zugkraft, was eine Ursache der Entstehung der AMD sein könne. Hierzu untersuchten sie 2019 den Einfluss von zyklischer Dehnung auf humane Pigmentepithelzellen und zeigten, dass diese mit einer Zunahme der ROS-Produktion assoziiert sei. Mit zunehmender Dauer der mechanischen Dehnung (20%) steige auch die Menge an ROS, so Liang, Wang et al., wobei das Maximum nach sechs Stunden erreicht sei. Hierfür verantwortlich seien vor allem die NOX2, welche erst nach 24 Stunden signifikant zunehme und die NOX4, welche sich bereits nach zwei Stunden erheblich vermehrt habe. Die mitochondriale Superoxid-Ionen-Expression sei hingegen bereits nach 15 Minuten signifikant erhöht, was zu einer Schädigung der mitochondrialen DNA führe und wiederum weitere reaktive Sauerstoffspezies freisetze. Dies führe zu einer starken oxidativen Zellschädigung und begünstige die Entstehung einer AMD.

Insgesamt zeigte sich, dass unterschiedliche Formen mechanischen Stresses, insbesondere Scherkräfte, zyklische Dehnung, aber auch Druck, das oxidative Gleichgewicht in einer Vielzahl menschlicher Zellen wie Endothelzellen von Gefäßen (78), Myozyten quergestreifter Herz- oder Skelettmuskulatur (81, 83), Zellen des Lungengewebes (80), Fibroblasten des uterinen Bandapparates (79) aber auch retinalen Epithelzellen (82) verändern und mit einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffverbindungen einhergehen können. Während es bei kurzzeitigen Beanspruchungen vorwiegend zu einer Erhöhung der ROS durch vor allem die NADPH-Oxidase komme, führe eine länger bestehende Belastung vermehrt zur

Expression antioxidativer Enzyme wie der Superoxid-Dismutase, der Glutathion-Peroxidase oder auch der Katalase.

Dass es in der vorliegenden Studie nicht zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffverbindungen gekommen ist, legt die Vermutung nahe, dass hierfür einerseits die punktuelle Druckbelastung oder die Dauer des mechanischen Stresses nicht ausgereicht habe und dass andererseits, angesichts oben genannter Studien, eine Steigerung der Intensität der mechanischen Belastung ebenfalls in einer Erhöhung der ROS-Produktion resultiert hätte. Der fehlende Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen in der DHE-Färbung als auch das Ausbleiben eines zusätzlichen Endothelzellverlustes in der Interventionsgruppe bestätigt die unter 5.2.1. gemachte Annahme, dass die Stärke der Fallkräfte im Fallversuch unterhalb der das Endothel schädigenden Grenze liegt.

5.2.3 Korrelationen der Nebenkriterien mit der initialen Endothelzelldichte und dem Endothelzellverlust

Die in der vorliegenden Studie gemachten Korrelationen beispielsweise zwischen initialer Endothelzelldichte mit Endothelzelldichte zum Messende ($r = 0,491$) und Messdauer ($r = 0,485$) oder auch Endothelzellverlust mit Spenderalter ($r = 0,321$) lassen sich unter anderem mit der Endothelzellqualität untersuchter Hornhäute, interindividuellen Unterschieden oder der Fallzahl der vorliegenden Studie erklären.

Die Qualität einer Hornhaut ermittelt sich anhand ihrer Endothelzelldichte bei Erstbestimmung. Qualitativ hochwertige Hornhäute, die als optisch bezeichnet werden, weisen Endothelzelldichten ≥ 2000 CEC/mm² auf (16). Hornhäute, die initial hohe Endothelzelldichten, wenig Nekroseinseln und apoptotische Zellen aufweisen, verfügten folglich über eine intaktere Endothelzellschicht als Hornhäute mit niedrigerer initialer Endothelzelldichte. Daraus ergibt sich sowohl eine längere Messdauer ($r = 0,485$) als auch eine höhere Endothelzelldichte zum Messende ($r = 0,491$) bei Erreichen des Abbruchkriteriums einer der beiden Hornhäute eines Hornhautpaares.

Während die vorliegende Studie keine Korrelation von Lagerungsdauer vor Versuchsbeginn und initialer Endothelzelldichte ($r = -0,086$) sowie Endothelzellverlust ($r = -0,131$) zeigte, weisen Untersuchungen anderer Autoren im Gegensatz hierzu auf

eine Zunahme des Endothelzellverlustes in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer hin (72, 73). Demnach müsste eine erhöhte Kultivierungsdauer vor Versuchsbeginn mit einem höheren Endothelzellverlust und somit mit einer niedrigeren initialen Endothelzellendichte assoziiert sein.

Dennoch gibt es zahlreiche interindividuelle Unterschiede wie Post-Mortem-Zeit, Todesursache, Spenderalter oder Todesumstände, welche die initiale Endothelzellendichte und den Endothelzellverlust beeinflussen (73) und somit die in der vorliegenden Studie fehlende Korrelation erklären.

Da sich die Endothelzellschicht menschlicher Hornhäute generell nicht regeneriert (13), stelle die Organkultivierung zudem eine Art Stress-Test für die Zelle dar (73). Ziel der Kultivierung sei es somit, die Endothelzellendichte bestmöglich aufrecht zu erhalten, bzw. den Endothelzellverlust zu minimieren (23). Eine längere Lagerungsdauer vor Versuchsbeginn müsste somit mit einem höheren Endothelzellverlust während dieses Zeitraumes assoziiert sein (72). Auf einen Zusammenhang von Lagerungsdauer vor Versuchsbeginn mit einem Endothelzellverlust nach Versuchsbeginn kann jedoch nicht geschlossen werden, da sich dieser anhand der initialen Endothelzellendichte und nicht anhand der Endothelzellendichte bei Inkulturnahme berechnet und als relativer Verlust ersterer aufgetragen wurde. Eine direkte Übertragung der Studienergebnisse zur Korrelation von Kultivierungsdauer und Endothelzellverlust nach Versuchsbeginn ist somit nicht möglich.

Um genauere Erkenntnisse über die Korrelation von Lagerungsdauer und Endothelzellverlust während dieses Zeitraumes zu erhalten, hätte in der vorliegenden Studie die Endothelzellendichte noch vor Versuchsbeginn ermittelt werden müssen, was aus organisatorischen Gründen, bzw. durch den Prozess der Freigabe für die wissenschaftliche Forschung, nicht möglich war.

Des Weiteren korrelierte eine geringe Post-Mortem-Zeit in vorliegender Untersuchung nicht mit der initialen Endothelzellendichte ($r = -0,129$), allerdings leicht negativ mit einem niedrigeren Endothelzellverlust ($r = -0,249$).

Untersuchungen von Hagenah, Lenk et al. aus dem Jahre 1993 zeigten, dass sich die Endothelzellendichte bis zu 72 Stunden bei 4°C und bis zu 36 Stunden bei 21°C nicht signifikant verringert, eine Entnahme der Hornhäute innerhalb dieses Zeitrahmens folglich ohne Endothelzellverlust möglich sei (84). Aus der Tatsache, dass Leichname im Regelfall in der Leichenhalle bei ± 4 °C gelagert werden (85), ergibt sich die

Verfahrensanweisung der Entnahme der Spenderhornhäute bis zu maximal 72 Stunden nach dem Tod des Spenders (86). Alle untersuchten Hornhäute wurden innerhalb dieses Zeitraumes entnommen, weshalb von einem Einfluss der Post-Mortem-Zeit auf die Höhe der initialen Endothelzelldichte nicht ausgegangen werden kann.

Die geringe negative Korrelation von Post-Mortem-Zeit und Endothelzellverlust beruht demnach vermutlich auf der geringen Fallzahl der vorliegenden Studie und sollte nicht als Einflussfaktor der initialen Endothelzelldichte und Endothelzellverlust gewertet werden.

Während das Spenderalter in vorliegender Studie nicht mit der initialen Endothelzelldichte korrelierte ($r = 0,053$), zeigte sich dennoch eine positive Abhängigkeit von Spenderalter und Endothelzellverlust ($r = 0,321$). Trotz fehlender Korrelation, hängt die initiale Endothelzelldichte mit dem Alter des Spenders zusammen, da sich die Endothelzelldichte ab Geburt mit zunehmenden Lebensjahr um 0,6 % verringert (4). Ergebnisse von Abdellah, Ammar et al. (87) und Augustin (5) zeigten zudem, dass ein höheres Lebensalter mit einer niedrigeren Endothelzelldichte assoziiert zu sein scheint. Auch hier sind jedoch ebenfalls interindividuelle Faktoren zu berücksichtigen, die die initiale Endothelzelldichte in der vorliegenden Studie gleichwohl beeinflussen und die fehlende Korrelation erklären könnten (73). Resultate der Cornea Donor Study des National Eye Institute (NEI) ergaben jedoch andererseits, dass ein höheres Spenderalter nicht mit einem höheren Endothelzellverlust nach Entnahme assoziiert zu sein scheint (88). Hierbei wurde jedoch nicht das Überleben organkultivierter, sondern das transplantiertes Sclerocorneal-Ringe nachverfolgt. Dennoch liefert die Cornea Donor Study Hinweise darauf, dass die Qualität der Spenderhornhäute, bzw. deren Endothelzellverlust, bei einer Beobachtung von 5 Jahren nicht mit dem Alter des Spenders assoziiert zu sein scheint und die beobachtete Korrelation in vorliegender Studie Resultat einer geringen Fallzahl ist.

Eine Follow-Up-Untersuchung der Patienten der Cornea Donor Study nach 10 Jahren zeigte jedoch, dass der Endothelzellverlust älterer Spender dennoch leicht höher war als der jüngerer Spender (89). Da sich hierbei der Endothelzellverlust lediglich um 3% (89) voneinander unterschied und es sich um einen Zeitraum von 10 Jahren handelte, kann in vorliegender Studie nicht auf eine tatsächliche Korrelation zwischen Spenderalter und Endothelzellverlust geschlossen werden.

Während männliche Spender in vorliegender Studie eine höhere initiale Endothelzellendichte aufwiesen ($r = 0,267$), zeigte sich zudem eine positive Korrelation zwischen weiblichem Geschlecht und Höhe des Endothelzellverlustes ($r = 0,337$). Abdellah, Ammar et al. zeigten, dass bezüglich der Kriterien Geschlecht und Alter Korrelationen bestünden, diese jedoch abhängig von der Ethnie zu sein scheinen (87). Diese Ergebnisse bestätigen die gefundenen Korrelationen, die in einer deutschen Population möglicherweise aufgrund der Ethnie auf tatsächliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen hinweisen. Weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen sind nötig, um diese Theorie zu bestätigen.

Die vorliegende Untersuchung zeigte zudem, dass 83 Prozent der Hornhautpaare, bei denen es zu einem plötzlichen hohen Endothelzellverlust gekommen war, der Kontrollgruppe zugeordnet werden konnten. Literatur, die ein ähnliches Phänomen beschreibt oder eine Erklärung hierfür liefert, gibt es aufgrund der geringen Datenlage bezüglich mechanischen Stresses und Kraft in Bezug auf die Endothelzellendichte bisweilen nicht.

Hier sind nachfolgende Untersuchungen notwendig, die sowohl den Einfluss mechanischer Kräfte unterhalb des Grenzwertes als möglichen protektiven Faktor, sowie Ursachen für plötzlichen Endothelzellverlust organkultivierter Hornhäute untersuchen.

5.3 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, sowie die weiterer genannter Studien, lassen die Schlussfolgerungen zu, dass Hornhaut-Endothelzellen anfällig für Krafteinwirkungen in Form von Kontakt- und intraokulärem Druck zu sein scheinen und mit einer Funktionsstörung wie die der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (8), einer morphologischen Schädigung (8, 54) oder ihrer Apoptose (8, 26, 54–60) reagieren.

Ursache hierfür scheint eine Kompression der Endothelschicht zu sein, was möglicherweise zu einer Überschreitung deren Elastizitätsgrenze mit anschließendem Zelluntergang führt (60) oder bei niedrigeren Drücken die Zelle lediglich verformt und ihre Morphologie dadurch schädigt (8, 54, 55).

Die Höhe des Drucks ist hierfür maßgeblich für die Höhe des Endothelzellverlust verantwortlich (55, 57) und scheint bei Drücken auf die Epithelzellschicht eine kritische

Grenze bei $> 5,7$ kPa (26) und bei direkten Drücken auf die Endothelzellschicht eine bei $> 2,8$ kPa (4, 90) zu haben.

Eine Erklärung für die abweichenden Grenzwerte liefert möglicherweise die Funktion des Hornhautstromas, das bei Krafteinwirkung auf die Epithelzellschicht eventuell einen Teil dieser Kraft abfängt und dadurch die Stärke, die auf die Endothelzellschicht einwirkt, reduziert. Da das Stroma bei der humanen Hornhaut 90 Prozent der Hornhautdicke ausmacht und vor allem aus gleichmäßig ausgerichteten Kollagenfasern und Keratozyten besteht, die in einer Proteoglykan-Grundsubstanz eingebettet sind (4, 91), bildet es prinzipiell das Bindegewebe der Hornhaut. Proteoglykane binden Wasser, schaffen Diffusionsräume und sind in der Lage, Druck abzufangen. Die Kollagenfasern sorgen zusätzlich für Stabilität (91). Auch die Descemet-Membran, die aufgrund ihrer Typ-VIII-Kollagene als besonders widerstandsfähig bezeichnet wird (91), könnte für die Stoßdämpfung bei Druck auf die Epithelzellschicht der Hornhaut verantwortlich sein. Drücke, die direkt auf die Endothelzellschicht der Hornhaut einwirken, wie sie beispielsweise bei erhöhtem intraokulärem Druck (8, 57–59) oder dem Kontakt mit Luftblasen (60) auftreten, werden folglich nicht durch die Zellschichten der Hornhaut abgefangen.

Ebenso wie die Zellschichten der Hornhaut Drücke abfangen könnten, scheint auch das Kulturmedium als eine Art „Stoßdämpfer“ für den Sclerocorneal-Ring zu fungieren. Ebenso wie das Gehirn und Rückenmark von Liquor cerebrospinalis umgeben ist, welcher unter anderem als mechanischer Dämpfer dem Schutz genannter Strukturen vor Traumata dient (92), bestünde die Möglichkeit, dass das Medium eine ähnliche Wirkung habe. Dass Flüssigkeiten vor Kompressionen und Drücken schützen, zeigt eine aktuelle Studie zur Rolle des Interstitiums, das sehr viel mehr Flüssigkeit enthalte als bislang angenommen (93).

Da das verwendete Medium aufgrund seiner Inhaltsstoffe wie 1g Glucose pro Liter Medium, bzw. 60 g Dextran T500 pro Liter Medium (siehe Anhang Tabelle 16, Seite 85), visköser als Wasser ist, könnte diese Tatsache ebenfalls zu einer Abschwächung der mechanischen Wirkung auf die Endothelzellschicht, bzw. auf die Hornhaut im Allgemeinen, geführt haben. Die Höhe der Viskosität, bzw. die Dichte einer bestimmten Flüssigkeit ist essenziell für das mechanische Dämpfungsverhalten dieser (94). Während Wasser eine Viskosität (η) von $\eta = 1,005$ mPa·s (95) bei 20 °C, bzw. eine Dichte von 998,21 kg/m³ (96) aufweist, liegt die Viskosität von M2, vereinfacht als ± 6

prozentige Zuckerlösung angenommen, bei circa $\eta = 1,175 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (95) und die Dichte bei $1021,9 \text{ kg/m}^3$. M1 ähnelt aufgrund des fehlenden Anteils von Dextran T500 der Dichte und Viskosität von Wasser. Ein Einfluss auf den Erhalt der Endothelzellqualität und -quantität durch die Viskosität bzw. Dichte des Mediums ist daher nicht auszuschließen und sollte in nachfolgenden Untersuchungen weiter analysiert werden.

Gleichwohl erhöhen sich jedoch durch die Zugabe von Dextran die Scherkräfte, die durch die Bewegung des Mediums über den Zellen entstehen, so Uzer, Pongkitwitoon et al. 2014 (97). Diese untersuchten den Einfluss von Scherkräften und Vibration auf die Proliferationsrate mesenchymaler Stammzellen in vitro. Dabei zeigte sich, dass Scherkräfte, die z.B. durch Vibrationen der Frequenz 30 Hz entstehen, eine Zellproliferation zwar nicht begünstigen, andererseits aber auch nicht zu Zellverlust führen (97).

Trotz nicht vorhandener Signifikanz zeigte die vorliegende Untersuchung trotz initial ähnlichem Verlauf (siehe Abb. 17 und Abb. 18, Seite 55 und 56) ein deutlich häufigeres Erreichen des Abbruchkriteriums durch Hornhäute der Kontrollgruppe. Dies könnte möglicherweise auf bisweilen unbekannte Mechanismen hindeuten, welche in nachfolgenden Studien genauer analysiert werden müssten. So bestünde die Möglichkeit, dass beispielsweise eine Erschütterung einer sich im Medium befindlichen Hornhaut zu einem mechanischen Lösen apoptotischer Zelltrümmer führt, wodurch sich die Nährstoffversorgung lebender Endothelzellen verbessern könnte.

Dass mechanische Einflüsse auch positive Effekte auf Zellen haben können, zeigten Untersuchungen von Kanie, Sakei et al. aus dem Jahr 2019, die den Einfluss von Vibrationen auf die Proliferationsrate von Zellkulturen pluripotenter Stammzellen analysierten. Während länger andauernde Vibration die Zellzahl verringerte, indem es die Zelladhäsion verschlechterte, führte kurzzeitige Vibration zu einer Verbesserung der Zellteilung und der Regeneration, so Kanie, Sakei et al. (98).

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Uzer, Pongkitwitoon et al., die eine absolute Zellzahlzunahme untersuchter mesenchymaler Stammzellen nach Einfluss von Vibration beschrieben, wobei die Höhe der Frequenz mit der Zellzahl korrelierte. Hierbei zeigte sich die größte Zunahme der Gesamtzellzahl bei Kombinationen von Frequenz und Beschleunigung, die mit der geringsten Flüssigkeitsscherung einhergingen (97).

Dass Rosenbaum, Reinhard et al. ein solches Ergebnis nicht zeigten, legt die Vermutung nahe, dass die Fallkräfte, die durch den Aufprall der in Styropor verpackten Hornhäute entstehen, hierfür nicht ausreichen. Weitere Untersuchungen, auch zur Klärung anderer Ursachen des plötzlichen Endothelzellverlustes, sollten somit angeschlossen werden.

Insgesamt zeigen sowohl die Ergebnisse anderer Studien als auch die Ergebnisse vorliegender Studie, dass Kraft, die in Form von Druck oder Kompression auf die Endothelzellschicht der Hornhaut einwirkt, bis zu einem gewissen Maß von dieser toleriert wird. Bei Drücken, die während der Entnahme, des Kultivierungsvorgangs in der Hornhautbank oder der Keratoplastik entstehen und je nach Art des Einflusses einen gewissen Grenzwert überschreiten, sollte mit einem Endothelzellverlust gerechnet werden.

Die Fallkraft, die auf organkultivierte im Glasgefäß befindliche Hornhäute bei einem Sturz aus 1,20 Meter entsteht und auf diese einwirkt, schädigt deren Endothelzellschicht jedoch nicht. Eine regelhafte Weiterverwendung der entsprechenden Hornhaut bleibt somit möglich. Dennoch sollte stets ein sorgsamer, ehrenvoller Umgang der Spenderhornhäute gepflegt werden, um andere bisweilen unbekannte Ursachen des plötzlichen Endothelzellverlustes zu vermeiden und die Hornhaut nicht bloß als Material, sondern vielmehr als Teil eines verstorbenen Menschen zu sehen und dessen Bereitschaft, nach seinem Tod einen Teil des eigenen Körpers einem anderen Menschen selbstlos zur Verfügung zu stellen, wert zu schätzen.

„Eine Organspende ist das größte Geschenk, das ein Mensch an einen anderen Menschen über seinen Tod hinaus weitergeben kann. Dies sollten insbesondere auch wir Mediziner uns immer wieder vor Augen führen.“ (99)

Axel Rahmel, Vorstand Deutsche Stiftung Organtransplantation

6 Zusammenfassung

Eine niedrige Endothelzellqualität organkultivierter Hornhäute stellt bislang die häufigste Ursache für das Verwerfen bereits entnommener Sclerocorneal-Ringe dar. Fallkräfte, die während der Entnahme, der Kultivierung oder unmittelbar vor der Keratoplastik auftreten und die Endothelzellqualität gefährden könnten, wurden bisweilen nur unzureichend untersucht. Ziel der durchgeführten Studie war daher, den Einfluss von mechanischem Stress in Form von Fallkräften auf organkultivierte, im Glasgefäß befindliche Hornhäute, zu analysieren.

Hierfür wurden 24 menschliche Sclerocorneal-Ringe in zwei Versuchsreihen (I: M2-Medium, II: M1-Medium) bis zu dem Erreichen eines zuvor definierten Abbruchkriteriums nachverfolgt. Während eine Hornhaut eines Hornhautpaares desselben Spenders der Interventionsgruppe zugewiesen wurde, bildete die jeweils andere Hornhaut die Kontrolle zu dieser. Die Hornhäute der Interventionsgruppe wurden in einem mit 40 ml Medium gefüllten Glasgefäß aus 1,20 Meter Höhe fallen gelassen und je nach Versuchsreihe (I: alle 3 Tage, II: alle 7 Tage) bis zum Erreichen von ≥ 75 Prozent Endothelzellverlust (ECL) ihrer initialen Endothelzelldichte kontinuierlich mikroskopiert. Bei Erreichen des Abbruchkriteriums wurde die Endothelzelldichte der jeweils anderen Hornhaut eines Hornhautpaares ebenfalls nicht weiter bestimmt.

Die Ergebnisse der ersten 21 Tage wurden anschließend mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test miteinander verglichen und sekundäre Einflussfaktoren wie Alter des Spenders, Post-Mortem-Zeit, Lagerungsdauer, Messdauer, Geschlecht und Endothelzelldichte zum Messende untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe (III) mit insgesamt 12 Hornhäuten wurde zudem mittels DHE-Färbung der Anteil reaktiver Sauerstoffverbindungen in der Endothelzellschicht nach dem Fallversuch quantifiziert.

Die Auswertung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Endothelzelldichte zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe ($\emptyset p = 1,64$). Auch die DHE-Färbung zeigte keine signifikante Zunahme des oxidativen Stresses in der Interventions- verglichen zur Kontrollgruppe. Die Betrachtung der Nebenkriterien ergab eine Korrelation der initialen Endothelzelldichte sowohl mit der Messdauer als auch mit der Endothelzelldichte zum Messende. Während Spenderhornhäute männlichen Geschlechts eine größere initiale Endothelzelldichte aufwiesen ($r = - 0,267$), zeigten Hornhäute von Spendern weiblichen Geschlechts einen höheren Endothelzellverlust ($r = 0,337$).

Insgesamt auffällig war, dass es in 50 Prozent der Fälle trotz initial ähnlichem Verlauf der absoluten Endothelzelldichte zu einem plötzlichen Erreichen des Abbruchkriteriums einer der beiden untersuchten Hornhäute kam und dies in 83 Prozent durch die Hornhäute der Kontrollgruppe bedingt war. Dieser Befund bedarf einer Bestätigung mittels weiterer Untersuchungen zur Endothelzelldichte und mechanischem Stress, liefert jedoch einen Hinweis darauf, dass leichte Erschütterung von sich im Medium befindlichen Hornhäuten sich unter Umständen protektiv auf die Endothelzellvitalität organkultivierter Hornhäute auswirkt.

7 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006.
2. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A et al. Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017.
3. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Kopf, Hals und Neuroanatomie: 123 Tabellen. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. (PrometheusLernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker).
4. Bowling B, Burk R, Tönjes S. Kanski's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz. 8. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2017. Verfügbar unter: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5553815>.
5. Augustin AJ. Augenheilkunde. 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2001. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-05919-7>.
6. Cejková J, Stípek S, Crkovská J, Ardan T, Pláteník J, Cejka C et al. UV Rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol Res* 2004; 53(1):1–10.
7. Redmond TM, Duke EJ, Coles WH, Simson JA, Crouch RK. Localization of corneal superoxide dismutase by biochemical and histochemical techniques. *Exp Eye Res* 1984; 38(4):369–78. doi: 10.1016/0014-4835(84)90192-1.
8. Li X, Zhang Z, Ye L, Meng J, Zhao Z, Liu Z et al. Acute ocular hypertension disrupts barrier integrity and pump function in rat corneal endothelial cells. *Sci Rep* 2017; 7(1):6951. doi: 10.1038/s41598-017-07534-9.
9. Sullivan L. Cornea and ocular surface anatomy and physiology: Australian Society of Ophthalmologists (ASO); 2013 [Stand: 12.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.slideshare.net/LaurenceSullivan/cornea-and-ocular-surface-anatomy-and-physiology>.
10. Adijanto J, Philp NJ. The SLC16A family of monocarboxylate transporters (MCTs)--physiology and function in cellular metabolism, pH homeostasis, and fluid transport. *Curr Top Membr* 2012; 70:275–311. doi: 10.1016/B978-0-12-394316-3.00009-0.
11. Nehrke K. H(OH), H(OH), H(OH): a holiday perspective. Focus on "Mouse Slc4a11 expressed in *Xenopus* oocytes is an ideally selective H⁺/OH⁻ conductance pathway that is stimulated by rises in intracellular and extracellular pH". *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 311(6):C942-C944. doi: 10.1152/ajpcell.00309.2016.
12. Patel SP, Parker MD. SLC4A11 and the Pathophysiology of Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy. *Biomed Res Int* 2015; 2015:475392. doi: 10.1155/2015/475392.
13. Lang GK, Hrsg. Augenheilkunde. 6., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
14. Janson BJ, Alward WL, Kwon YH, Bettis DI, Fingert JH, Provencher LM et al. Glaucoma-associated corneal endothelial cell damage: A review. *Surv Ophthalmol* 2018; 63(4):500–6. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.11.002.
15. BÄK. Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank, Erste Fortschreibung [Richtlinie]. Deutsches Ärzteblatt; 2018.
16. Augenlinik/Hornhautbank Universitätsmedizin Mainz. Verfahrensanweisung HB-B-3-S-1-Umgang mit Spenderhornhäuten; AU_D_AA_HB-B-3-S-1-Umgang mit Spenderhornhäuten_20180619.
17. Augenlinik/Hornhautbank Universitätsmedizin Mainz. Verfahrensanweisung HB-B-2-S-1-Entnahme der Spenderhornhaut; AU_D_VA_HB-B-2-S-1-Entnahme der Spenderhornhaut_20180621. Mainz; 21.6.2018.
18. Augenlinik/Hornhautbank Universitätsmedizin Mainz. Verfahrensanweisung HB-B-1-A-3-Ausschlusskriterien für eine Hornhautspende (D23641). Mainz. Version 3 [Stand: 05.11.2019].

19. Duncker GIW, Wilhelm FW, Bredehorn T. Augenbanken: De Gruyter.
20. Augenklinik/Hornhautbank Universitätsmedizin Mainz. HB-B-1-A-5-Anamneseerhebung (D23642). Mainz [Stand: 05.11.2019].
21. Reinshagen H, Maier PC, Böhringer D. Aktivitäten der Sektion Gewebetransplantation und Biotechnologie der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft: Leistungsbericht 2017. *Klin Monbl Augenheilkd* 2019; 236(10):1229–32. doi: 10.1055/a-0838-5999.
22. Dritter Bericht der Bundesregierung über die Situation der Versorgung der Bevölkerung mit Gewebe und Gewebezubereitungen: nach Artikel 7a Gewebegesetz (betrachteter Zeitraum 01.01.2014 bis 31.12.2017); 2018.
23. Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10):2887–93.
24. Apel M, Pfeiffer N, Pusch T. Jahresbericht der Hornhautbank Mainz 2018: Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität; 2018 [Stand: 19.11.2019]. Verfügbar unter: http://www.unimedizin-mainz.de/typo3temp/secure_downloads/9806/0/17ba740418e4dcb25b6b64aa86e58011873b7933/Flyer_Jahresbericht_Hornhautbank_110419_RZ.pdf.
25. Apel M. Statistische Daten der Hornhautbank Mainz aus dem Jahr 2017 [E-Mail]. Mainz; 2018 08.11.2018.
26. Ramirez-Garcia MA, Khalifa YM, Buckley MR. Vulnerability of corneal endothelial cells to mechanical trauma from indentation forces assessed using contact mechanics and fluorescence microscopy. *Exp Eye Res* 2018; 175:73–82. doi: 10.1016/j.exer.2018.06.005.
27. Bhadange Y, Lautert J, Li S, Lawando E, Kim ET, Soper MC et al. Hypoxia and the Prolyl Hydroxylase Inhibitor FG-4592 Protect Corneal Endothelial Cells From Mechanical and Perioperative Surgical Stress. *Cornea* 2018; 37(4):501–7. doi: 10.1097/ICO.0000000000001430.
28. Scharl M, Gessler M, Eckardstein A von. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen: Mit über 1000 Abbildungen ; große Falttafel mit Stoffwechselübersicht*. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
29. Berke A. Freie Radikale und Hornhaut. *die Kontaktlinse* 2004; (6):2–10 [Stand: 14.10.2019]. Verfügbar unter: https://www.hfak.de/dozenten/berke/schriften/KL_06_04_freie_Radikale.pdf.
30. Serbecic N, Beutelspacher SC. Vitamins inhibit oxidant-induced apoptosis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol* 2005; 49(5):355–62. doi: 10.1007/s10384-005-0209-9.
31. Briviba K, Heinzow B, Schwenk M. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2008; 51(12):1464–82. doi: 10.1007/s00103-008-0720-5.
32. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(8):1047–55. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.021.
33. Kooij A, Bosch KS, Frederiks WM, van Noorden CJ. High levels of xanthine oxidoreductase in rat endothelial, epithelial and connective tissue cells. A relation between localization and function? *Virchows Arch B, Cell Pathol* 1992; 62(3):143–50. doi: 10.1007/bf02899676.
34. Frederiks W. The proportion of xanthine oxidase activity of total xanthine oxidoreductase activity in situ remains constant in rat liver under various (patho)physiological conditions. *Hepatology* 1996; 24(5):1179–84. doi: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008903395.
35. Cejková J, Ardan T, Filipec M, Midelfart A. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase in human cornea. *Histol Histopathol* 2002; 17(3):755–60. doi: 10.14670/HH-17.755.
36. Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Hisamura R, Masuda N, Imagawa T et al. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(4):1552–8. doi: 10.1167/iovs.06-1027.

37. Cejka C, Cejkova J. Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015:591530. doi: 10.1155/2015/591530.
38. Gogia R, Richer SP, Rose RC. Tear fluid content of electrochemically active components including water soluble antioxidants. *Curr Eye Res* 1998; 17(3):257–63. doi: 10.1076/ceyr.17.3.257.5213.
39. Bode AM, Vanderpool SS, Carlson EC, Meyer DA, Rose RC. Ascorbic acid uptake and metabolism by corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(8):2266–71.
40. Serbecic N, Beutelspacher SC. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2005; 320(3):465–75. doi: 10.1007/s00441-004-1030-3.
41. Bilgihan A, Bilgihan K, Yis O, Sezer C, Akyol G, Hasanreisoglu B. Effects of topical vitamin E on corneal superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and polymorphonuclear leucocyte infiltration after photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol Scand* 2003; 81(2):177–80. doi: 10.1034/j.1600-0420.2003.00042.x.
42. Pappa A, Sophos NA, Vasiliou V. Corneal and stomach expression of aldehyde dehydrogenases: from fish to mammals. *Chem Biol Interact* 2001; 130-132(1-3):181–91. doi: 10.1016/s0009-2797(00)00233-7.
43. Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(3):471–5.
44. Crouch RK, Goletz P, Snyder A, Coles WH. Antioxidant enzymes in human tears. *J Ocul Pharmacol* 1991; 7(3):253–8.
45. Cejková J, Vejrazka M, Pláteník J, Stípek S. Age-related changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase activities in the rabbit cornea. *Exp Gerontol* 2004; 39(10):1537–43. doi: 10.1016/j.exger.2004.08.006.
46. Atalla LR, Sevanian A, Rao NA. Immunohistochemical localization of peroxidative enzymes in ocular tissue. *CLAO J* 1990; 16(1 Suppl):S30-3.
47. Faragher RG, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S, Khaw PT. Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(10):814–7. doi: 10.1136/bjo.81.10.814.
48. Schindler E, Pschyrembel. *Psychrembel Online Klinisches Wörterbuch*. 266., akt. Aufl. Berlin, New York: De Gruyter; 2014 [Stand: 23.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/>.
49. Brockhaus Enzyklopädie: MOE-NOR. 19., völlig neu bearbeitete Auflage. Mannheim: F.A. Brockhaus GmbH; 1991. (Bd. 15).
50. Baker J. 50 Schlüsselideen Physik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
51. Höfler A. Grundlagen der Verformung [Stand: 25.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.tec-science.com>.
52. Höfler G, Kreipe HH, Moch H, Hrsg. *Pathologie: Das Lehrbuch : mit 1.300 meist farbigen Abbildungen und rund 150 Tabellen*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. München: Elsevier; 2019.
53. Rosenbaum K, Reinhard T, Sundmacher R. Einflussfaktoren auf das Hornhautendothel in Organkultur während des Transports. *Der Ophthalmologe* 2004; 101(12):1209–13. doi: 10.1007/s00347-004-1035-z.
54. Vohra V, Chawla H. Corneal endothelial decompensation due to airbag injury. *Int Ophthalmol* 2018; 38(5):2171–4. doi: 10.1007/s10792-018-0999-7.
55. Fukagawa K, Tsubota K, Kimura C, Hata S, Mashita T, Sugimoto T et al. Corneal endothelial cell loss induced by air bags. *Ophthalmology* 1993; 100(12):1819–23. doi: 10.1016/s0161-6420(13)31394-3.
56. Motley W, Kaufman AH, West CE. Pediatric airbag-associated ocular trauma and endothelial cell loss. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 2003; 7(6):380–3. doi: 10.1016/S1091-8531(03)00217-9.

57. Sihota R, Lakshmaiah NC, Titiyal JS, Dada T, Agarwal HC. Corneal endothelial status in the subtypes of primary angle closure glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003; 31(6):492–5. doi: 10.1046/j.1442-9071.2003.00710.x.
58. Sugar A, Tanner JP, Dontchev M, Tennant B, Schultze RL, Dunn SP et al. Recipient risk factors for graft failure in the cornea donor study. *Ophthalmology* 2009; 116(6):1023–8. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.12.050.
59. Gagnon MM, Boisjoly HM, Brunette I, Charest M, Amyot M. Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea* 1997; 16(3):314–8.
60. Kim EK, Cristol SM, Geroski DH, McCarey BE, Edelhauser HF. Corneal endothelial damage by air bubbles during phacoemulsification. *Arch Ophthalmol* 1997; 115(1):81–8. doi: 10.1001/archophth.1997.01100150083014.
61. Fisher Scientific. Introduction Manual: Fisher Scientific Model 100 Ultrasonic Dismembrator [Part. Number CPN-214-161]; Fisher Scientific; 2001.
62. Bücheler E. Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Interventionen. 11., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006.
63. Brockhaus Enzyklopädie. 19., völlig neu bearbeitete Auflage. Mannheim: F.A. Brockhaus GmbH; 1989. (Bd. 9).
64. Müller A. Lexikon der Astronomie: Gravitation; 2007-2014 [Stand: 25.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/astronomie/gravitation/150>.
65. Pusch T. Statistische Daten der Hornhautbank Mainz aus dem Jahr 2018 [E-Mail]. Mainz; 2019 05.11.2019.
66. Spelsberg H, Reinhard T, Sundmacher R. Hornhautepithelschädigung bei langer Transplantatverweildauer in dextranhaltigem Organkulturmedium. *Klin Monbl Augenheilkd* 2002.
67. Reim M, Hesse, R., Pietruschka, G. Über den Stoffwechsel von Organkulturen der Cornea in TC 199 mit Zusatz von Dextran 500 oder HAES 450. *Klin Monbl Augenheilkd*; 1990(196):76–80.
68. Laurindo FR, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products. In: Nitric Oxide, Part G Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling: Elsevier; 2008. S. 237–60 (Methods in Enzymology).
69. Cho S, Hwang ES. Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence. *Methods Cell Biol* 2011; 103:149–88. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00007-3.
70. Gallop PM, Paz MA, Henson E, Latt SA. Dynamic approaches to the delivery of reporter reagents into living cells; 1984 [Stand: 22.10.2019].
71. Redbrake C, Frantz A, Salla S. Korrelation zwischen Glucose- und Laktatkonzentrationen in der humanen Hornhaut und im Organkulturmedium. *Klin Monbl Augenheilkd* 1998; 213(2):93–6. doi: 10.1055/s-2008-1034953.
72. Pels E, Schuchard Y. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol* 1983; 56(1-2):147–53. doi: 10.1007/BF00154722.
73. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol* 2008; 28(3):155–63. doi: 10.1007/s10792-007-9086-1.
74. Hagenah M, Carstens D, Böhnke M, Winter R. Entwicklung der Endothelzellichte bei Verwendung von frischem und organkultiviertem Gewebe. *Der Ophthalmologe* 1997; 94(2):90–3. doi: 10.1007/s003470050086.
75. Chapanis A. The relevance of laboratory studies to practical situations. *Ergonomics* 1967; 10(5):557–77. doi: 10.1080/00140136708930910.
76. Winkler RL, Murphy AH. Experiments in the laboratory and the real world. *Organizational Behavior and Human Performance* 1973; 10(2):252–70. doi: 10.1016/0030-5073(73)90017-2.

77. Huppertz H [Stand: 29.11.2019]. Verfügbar unter: <https://kfz-tech.de/Biblio/Sicherheit/AirbagB.htm>.
78. Lehoux S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2):269–79. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.008.
79. Hu M, Hong L, Hong S, Min J, Zhao Y, Yang Q et al. Mechanical stress influences the viability and morphology of human parametrial ligament fibroblasts. *Mol Med Rep* 2017; 15(2):853–8. doi: 10.3892/mmr.2016.6052.
80. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(5):L834-41. doi: 10.1152/ajplung.00069.2005.
81. Shimosawa T. Mechanical stress and humoral factors linked to the induction of oxidative stress. *Hypertens Res* 2006; 29(9):643–4. doi: 10.1291/hypres.29.643.
82. Liang X, Wang Z, Gao M, Wu S, Zhang J, Liu Q et al. Cyclic stretch induced oxidative stress by mitochondrial and NADPH oxidase in retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol* 2019;79. doi: 10.1186/s12886-019-1087-0.
83. Ward CW, Prosser BL, Lederer WJ. Mechanical stretch-induced activation of ROS/RNS signaling in striated muscle. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(6):929–36. doi: 10.1089/ars.2013.5517.
84. Hagenah M, Lenk C, Winter R. Entwicklung der Endothelzellichte von Hornhäuten mit langen Post-Mortem-Zeiten bei Kurzzeitkonservierung mit Optisol. *Spektrum Augheilkd* 1993; 7(5):206–9. doi: 10.1007/BF03163930.
85. Kramer H. Klinikum verlangt Pauschal-Auslöse für Verstorbene: Abgabegebühr: Potsdamer Zeitungsverlagsgesellschaft mbH & Co. KG; 2017. Verfügbar unter: <https://www.pnn.de/potsdam/abgabegebuehr-klinikum-verlangt-pauschal-ausloese-fuer-verstorbene/21303952.html>.
86. Augenklinik/Hornhautbank Universitätsmedizin Mainz. Verfahrensanweisung HB-B-3-S-2-Kontrolle der Spenderhornhäute; AU_D_AA_HB-B-3-S-2 -Kontrolle der Spenderhornhäute_20180619. Mainz; 19.6.2018.
87. Abdellah MM, Ammar HG, Anbar M, Mostafa EM, Farouk MM, Sayed K et al. Corneal Endothelial Cell Density and Morphology in Healthy Egyptian Eyes. *J Ophthalmol* 2019; 2019:6370241. doi: 10.1155/2019/6370241.
88. Gal RL, Dontchev M, Beck RW, Mannis MJ, Holland EJ, Kollman C et al. The effect of donor age on corneal transplantation outcome results of the cornea donor study. *Ophthalmology* 2008; 115(4):620-626.e6. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.01.003.
89. Lass JH, Benetz BA, Gal RL, Kollman C, Raghinaru D, Dontchev M et al. Donor age and factors related to endothelial cell loss 10 years after penetrating keratoplasty: Specular Microscopy Ancillary Study. *Ophthalmology* 2013; 120(12):2428–35. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.08.044.
90. Machiele R, Motlagh M, Patel BC. *StatPearls: Intraocular Pressure*. Treasure Island (FL); 2019.
91. Deller T. *Sobotta Lehrbuch Histologie: Mit Zugang zur mediscript Lernwelt*. 4. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2014.
92. Bergua A. Liquor cerebrospinalis. In: Bergua A, Hrsg. *Das menschliche Auge in Zahlen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. S. 133–7.
93. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D et al. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci Rep* 2018; 8(1):4947. doi: 10.1038/s41598-018-23062-6.
94. Schellander J, Strauss A. Dämpfungsverhalten unterschiedlicher Fluide in einem Flüssigkeitstilgersystem. *Bautechnik* 2016; 93(2):68–84. doi: 10.1002/bate.201500074.
95. Roßmann B, Kayser E. Viskositätsmessung an wässrigen Zucker- und Natriumphosphatlösungen. *Kolloid-Zeitschrift* 1944; 109(3):161–2. doi: 10.1007/BF01502618.

96. Otto von Guericke Universität Magdeburg. Lehrstuhl Strömungsmechanik und Strömungstechnik - Arbeitsheft [Stand: 11.11.2019]. Verfügbar unter: <http://www.uni-magdeburg.de/isut/LSS/Lehre/Arbeitsheft/inhalt.html>.
97. Uzer G, Pongkitwitoon S, Ete Chan M, Judex S. Vibration induced osteogenic commitment of mesenchymal stem cells is enhanced by cytoskeletal remodeling but not fluid shear. *J Biomech* 2013; 46(13):2296–302. doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.06.008.
98. Kanie K, Sakai T, Imai Y, Yoshida K, Sugimoto A, Makino H et al. Effect of mechanical vibration stress in cell culture on human induced pluripotent stem cells. *Regenerative Therapy* 2019. doi: 10.1016/j.reth.2019.05.002.
99. Rahmel A. Eröffnungsrede Fachkongress der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO). Frankfurt/M; 2016 [Stand: 30.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.mta-dialog.de/artikel/mehrwertschaetzung-fuer-die-organspender.html>.

8 Anhang

Tabelle 15: Kontraindikationen von Hornhautspenden (Quelle: Anamnesebogen zur Hornhautspende der Universitätsmedizin Mainz (20)).

Absolute Kontraindikationen	Relative Kontraindikationen
<ul style="list-style-type: none"> - Ablehnung der Organ- und/oder Gewebespende - Bekannte HIV-, Hepatitis B oder C, HTLV I/II-Infektion oder Anzeichen von Risikofaktoren für diese Infektionen - Systemische virale, Pilz- oder parasitäre Infektion, die zum Zeitpunkt der Spende nicht unter Kontrolle ist - Jemals nachgewiesene Infektion mit Protozoen - Zentralnervöse Erkrankungen unklarer Genese - Risiko von Krankheitsübertragung durch Prionen - Anzeichen sonstiger Risikofaktoren für Infektionskrankheiten (Reiseverhalten, Wohnsitz) - Aufnahme toxischer Substanzen - Impfung mit Lebendimpfstoff < 4 Wochen - Postexpositionelle Tollwutimpfung < 12 Wochen - Empfang von Hetero- und Xenotransplantaten - Hämatologische Neoplasien - Augenvorerkrankungen 	<ul style="list-style-type: none"> - Erkrankung unbekannter Ätiologie oder unbekannter Todesursache - Anzeichen für ungültige Untersuchungsergebnisse der Spenderblutproben wegen Hämodilution mit > 50% Plasmaverdünnung - Refraktiv-chirurgische Eingriffe - Maligne Tumorerkrankungen in der Anamnese

Tabelle 16: Zusammensetzung der Kulturmedien M1 und M2. Alle Angaben in mg/l.
(Quelle: Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland).

Kulturmedium M1 (modifiziert)		Kulturmedium M2 (modifiziert)	
Inhaltsstoffe	Menge	Inhaltsstoffe	Menge
<u>MEM:</u>		<u>MEM:</u>	
L-Arginin.HCl	126	L-Arginin.HCl	126
L-Cystin	24	L-Cystin	24
L-Histidin.HCl.H ₂ O	42	L-Histidin.HCl.H ₂ O	42
L-Isoleucin	52	L-Isoleucin	52
L-Leucin	52	L-Leucin	52
L-Lysin.HCl	73	L-Lysin.HCl	73
L-Methionin	15	L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32	L-Phenylalanin	32
L-Thyreonin	48	L-Thyreonin	48
L-Tryptophan	10	L-Tryptophan	10
L-Tyrosin	36	L-Tyrosin	36
L-Valin	46	L-Valin	46
L-Glutamin	292	L-Glutamin	292
Folsäure	1	Folsäure	1
Cholinchlorid	1	Cholinchlorid	1
Nicotinamid	1	Nicotinamid	1
D-Ca-Pantothenat	1	D-Ca-Pantothenat	1
Pyridoxal.HCl	1	Pyridoxal.HCl	1
Riboflavin	0,05	Riboflavin	0,05
I-Inosit	2	I-Inosit	2
Thiamin.HCl	1	Thiamin.HCl	1
<u>Earle's Salze:</u>		<u>Earle's Salze:</u>	
NaCl	6800	NaCl	7740
KCl	400	KCl	400
NaH ₂ PO ₄ .HCl	140	NaH ₂ PO ₄ .HCl	140
MgSO ₄ .7H ₂ O	200	MgSO ₄ .7H ₂ O	200
CaCl ₂ .H ₂ O	265	CaCl ₂ .H ₂ O	265
NaHCO ₃	2198	NaHCO ₃	2198
D-Glucose	1000	D-Glucose	1000
Phenolrot-Na	10,6	Phenolrot-Na	10,6
Hepes	2979	Hepes	2979
Amphotericin B (100%)	2,5	Amphotericin B	2,5
Penicillin-G-Na	59,98	Penicillin-G-Na	59,88
Streptomycinsulfat	130,55	Streptomycinsulfat	132,98
		Dextran T500	60000

9 Danksagung

Bei der Entstehung dieser Arbeit waren viele Personen beteiligt, denen ich im Folgenden gerne für ihre Unterstützung und ihre Hilfe danken möchte.

Meinem Betreuer möchte ich für die Leitung und Betreuung dieser Arbeit danken, der trotz des klinischen Alltags jederzeit für mich ansprechbar war und mich unterstützte, diese Arbeit fertig zu stellen.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen der Hornhautbank Mainz, die mir geduldig mit Rat und Tat zur Seite standen, mich in allen laborspezifischen Fragestellungen unterstützten und Teile ihrer Freizeit dafür verwendeten, mir bei meiner Arbeit behilflich zu sein.

Bei der Leitung der Hornhautbank möchte ich mich zudem für die freundliche Bereitstellung von statistischen Daten der Hornhautbank Mainz bedanken.

Bei den Kollegen des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) bedanke ich mich ebenfalls recht herzlich für die Unterstützung bei der Erstellung und Überprüfung der statistischen Aussagen meiner Arbeit.

Einen besonderen Dank gilt auch meinen Eltern und meinen Freunden, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben und mir stets helfend zur Seite standen.

Allen Verstorbenen möchte ich zudem für ihre Bereiterklärung zur Hornhautspende danken und die Möglichkeit, diese für die wissenschaftliche Forschung zu verwenden.