

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

Antioxidative Wirksamkeit von Resveratrol auf korneales Endothel
- Untersuchung an Spenderhornhäuten

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

Vorgelegt von

Madeline Rödiger
aus Weimar

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 17. Juli 2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	5
2.1 Die Kornea.....	5
2.1.1 Funktion und Aufbau der Kornea	5
2.1.2 Das korneale Endothel.....	7
2.2 Hornhauttransplantation	9
2.2.1 Kriterien zur Spende, Entnahme und Transplantation	9
2.2.2 Die Keratoplastik - Indikation und operative Verfahren.....	11
2.2.3 Erfolg und Probleme der Hornhauttransplantation.....	12
2.2.4 Kultivierung der Hornhaut	15
2.2.5 Anforderungen Hornhauttransplantat und Endothelevaluierung.....	17
2.3 Hornhautbanken	18
2.3.1 Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz	19
2.4 Oxidativer Stress	19
2.4.1 Exkurs zum Thema Endothelzellverluste durch oxidativen Stress	20
2.5 Antioxidative Abwehrmechanismen der Hornhaut.....	23
2.6 Resveratrol	25
2.6.1 Effekte von Resveratrol.....	25
2.6.2 RSV in ophthalmologischen Studien.....	26
3 Material und Methoden.....	29
3.1 Studiendesign.....	29
3.2 Materialien	30
3.3 Organkultur.....	31
3.4 Balanced Salt Solution	31
3.5 (D)PBS	32
3.6 Mikroskop	32
3.7 Methoden.....	33
3.7.1 Spenderhornhäute	33
3.7.2 Mikroskopische Bestimmung der Endothelzelldichte	34
3.7.3 Endothelzellzählung.....	36

3.7.4	Behandlung der Spenderhornhäute	36
3.7.4.1	1. Versuchsreihe - Induktion von oxidativem Stress und Bestimmung der H ₂ O ₂ -Konzentration.....	37
3.7.4.2	Resveratrol- vs. Kontrollgruppe - 3. Versuchsreihe	39
3.7.4.3	Wirkungsstudie von RSV und DMSO - 4. Versuchsreihe	40
3.7.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium-Färbung ..	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Statistische Analyse	43
4.2	Induktion von oxidativem Stress mittels H ₂ O ₂	43
4.3	Wirkung der verwendeten Substanzen (RSV und DMSO).....	44
4.4	Effekt von RSV auf korneale Endothelzellen	45
5	Diskussion.....	48
5.1	Zusammenfassung der Erkenntnisse	48
5.2	Diskussion der Ergebnisse	48
5.2.1	Kornealer Endothelzellverlust durch oxidativen Stress.....	48
5.2.2	Resveratrol und seine Wirkung auf korneales Endothel in Kultivierung	50
5.2.3	DMSO und seine Wirkung auf corneales Endothel.....	52
5.3	Diskussion der angewendeten Methoden	54
5.4	Verwendung von Spenderhornhäuten.....	54
5.5	Die Zugabe von RSV in Kulturmedium.....	56
5.6	Verwendung des Kulturmediums M2 über die empfohlene Kultivierungszeit hinaus	57
5.7	Kriterien der Endothelevaluation	59
5.7.1	Endothelzelldichte	59
5.7.2	Endothelzellvitalität	60
5.8	Ausblick und offene Fragen.....	62
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Anhang.....	77
9	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anatomischer Schnitt durch die Hornhaut sowie durch die Linse und ihren Halteapparat (1).....	5
Abbildung 2:	Histologischer Aufbau der Kornea (21)	6
Abbildung 3:	Mikroskopische Darstellung des kornealen Endothels	8
Abbildung 4:	Eduard Zirm	9
Abbildung 5:	Formen der Keratoplastik.....	11
Abbildung 6:	Organkultivierte Korneoskleralscheiben im Brutschrank bei 34 °C. Jede Hornhaut ist in einer speziellen Halterung aufgehängt und wird in einem durchsichtigen Gefäß gelagert.	17
Abbildung 7:	Strukturformel von Resveratrol	25
Abbildung 8:	BSS-Lösung aus Herstellung der Universitätsmedizin Mainz.....	32
Abbildung 9:	Nikon Eclipse TE2000-5 der Hornhautbank Mainz	33
Abbildung 10:	Robin Endothel Analyzer	35
Abbildung 11:	Endothelausschnitt in Bildformat. Bearbeitung und Endothelzellzählung mit ImageJ.	36
Abbildung 12:	Graphische Darstellung der zeitlichen Zelldichteveränderung über die Kulturzeit und entsprechend der Konzentration sowie Expositionszeit.....	44
Abbildung 13:	Darstellung der zeitlichen Zelldichteveränderung in den unterschiedlichen Gruppen (Kontrolle, DMSO und DMSO + RSV).	45
Abbildung 14:	Darstellung der zeitlichen Zellzahlveränderung und Nekroseraten des Hornhautendothels in der Wirkungs- und Kontrollgruppe über 8 Tage nach Inkubation mit H ₂ O ₂	46
Abbildung 15:	<i>Darstellung der Dihydroethidium-Leuchtintensität des Hornhautendothels unmittelbar nach H₂O₂-Exposition.</i>	47
Abbildung 16:	Mikroskopische Darstellung des Hornhautendothels.....	60
Abbildung 17:	250-fache Vergrößerung. Untersuchung einer kultivierten Spenderhornhaut in M2	61
Abbildung 18:	250-fache Vergrößerung. Untersuchung der gleichen Spenderhornhaut in BSS nach weiteren 7 Tagen in Organkultur.....	62
Abbildung 19:	Rezeptur Kulturmedium I, Biochrom AG	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Materialien in der Hornhautbank.....	30
------------	---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMG	Arzneimittelgesetz
BSS	engl.: <i>Balances-Salt-Solution</i>
DGFG	Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation
DHE	Dihydroethidium
D.h.	das heißt
DMEK	<i>Descemetmembran-Endothelial-Keratoplasty</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSAEK	<i>Descemet Stripping Automated Endothelia Keratoplasty</i>
Dpt.	Dioptrien
EEBA	Europen Eye Bank Association
EZD	Endothelzelldichte
EZV	Endothelzellverlust
<i>iROS</i>	intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies
TPG	Transplantationsgesetz
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCE	Humane Hornhautepithelzellen
HCEC	Humane corneale Endothelzellen
HH	Hornhaut
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HHB	Hornhautbank
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSH	Glutathion (oxidierte Form)
MDA	Malondialdehyd
Lat.	lateinisch
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
REA	Robin Endothel Analyser
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSV	Resveratrol

RPE	Retinales Pigmentepithel (engl. <i>retinal pigment epithelium</i>)
SOD	Superoxiddismutase
TM	Trabekelnetzwerk
TRP	Transplantatreaktion
usw.	und so weiter
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WHO	<i>World Health Organisation</i> (dt. Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Das Auge als sensorisches Organ dient zur Wahrnehmung von Lichtreizen. Es nimmt pro Sekunde mehr als 10 Millionen Informationen auf und leitet sie in Form elektrischer Impulse von der Netzhaut bis zum sensorischen Kortex weiter. Der Aufbau und die Funktion des Sinnesorgans Auge ist sehr komplex. Die Hornhaut (*lat. Cornea*) ist die äußerste Schicht des menschlichen Auges, sie ist ein vorgewölbtes Fenster, das Licht ins Augennere lässt und zugleich optische Eigenschaften zum Scharfsehen mitbringt. Aufgrund von Verletzungen, Infektionen, Degenerationen oder Dystrophien kann es zu einer Trübung oder irregulären Wölbung der Kornea kommen, die das Sehvermögen einschränkt oder sogar zur Erblindung führt. In diesen Fällen wird oft die Indikation zur Keratoplastik (Hornhauttransplantation) gestellt (1).

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation [WHO]*) zufolge leben weltweit ungefähr 45 Millionen per definitionem erblindete Menschen und weitere 135 Millionen Menschen mit stark eingeschränktem Sehvermögen (2). Hornhauttrübungen zählen weltweit zu den häufigsten Ursachen von Blindheit, weshalb ihre Behandlung aus medizinischer Sicht von größter Bedeutung (2) ist. Die Hornhauttransplantation bleibt die Standardmethode für eine visuelle Rehabilitation, hängt jedoch stark von der Verfügbarkeit von Spendergewebe ab, was aktuell den begrenzenden Faktor darstellt. Im Jahr 2012 wurden weltweit 184576 Hornhauttransplantationen durchgeführt, wobei diese aus 283530 Hornhautspenden beschafft und in 742 Augenbanken gelagert wurden (2-4). Das wesentliche Problem bei der bedarfsgerechten Versorgung von Patienten mit kornealen Transplantaten stellt, trotz positivem Trend von in Kultur genommen Hornhäuten, der Mangel an verfügbaren Spenderhornhäuten dar. Die fehlende Zustimmungsbereitschaft der Angehörigen, das Nichterkennen eines möglichen Hornhautspenders und die unterlassene Befragung der Angehörigen werden als Hauptursache für die Diskrepanz zwischen potenziellen und tatsächlichen Spendern angesehen. Dieser Engpass soll durch den kontinuierlichen Aufbau von Hornhautbanken in Zukunft überwunden werden (1).

Angesichts steigender Nachfrage nach Hornhauttransplantaten, zunehmender Alterung der Gesellschaft und sinkender Spenderbereitschaft in der Bevölkerung sollten die Bemühungen zur Förderung der Hornhautspende in allen Ländern fortgesetzt werden und zur Steigerung der absoluten Transplantationszahlen als Ansatz zum einen eine stärkere Aufklärung in der Bevölkerung bzgl. Gewebespende geleistet werden, zum anderen gilt es aber auch die relativ hohe Verwerfungsrate an Hornhauttransplantaten zu reduzieren (5).

Der wichtigste Verwerfungsgrund von Spenderhornhäuten ist in erster Linie eine mangelhafte Endothelzellqualität (42%) (5). Um die Verwerfungsrate von 30-40 % effektiv zu reduzieren,

muss zukünftig schon früh in der gesamten Prozesskette der Hornhauttransplantation angesetzt werden und bereits der initiale Verlust von kornealen Endothelzellen in der Spende- sowie der Gewebekonservierungsphase deutlich gesenkt werden (6, 7). In einer Studie wurde gezeigt, dass bereits in der mechanisch traumatischen Hornhautentnahme und anschließenden präoperativen Kultivierungszeit Endothelzellverluste beobachtet werden, daher sollte hier der präventive Schutz des kornealen Endothels besonders wichtig sein (8). Diese Endothelzellverluste entstehen direkt durch das Operationstrauma (9) sowie durch einen apoptotischen Zelltod bei Überschreitung der kritischen intrazellulären Produktion an reaktiven Sauerstoffverbindungen (10). Die häufigste Form des Transplantatversagens oder -verwurfs ist einerseits eine unzureichende Endothelzellqualität vor Transplantation und andererseits eine postoperative Transplantatabstoßung, die ebenso mit Endothelzellverlusten korreliert. Die Mechanismen des Endothelzellverlusts sind in den vergangenen Jahren zahlreich untersucht worden und dabei als wesentliche Faktoren die Apoptose als auch die Lipidperoxidation identifiziert (11), die durch erhöhten oxidativen Stress entstehen. Die Entwicklung neuer Methoden, die zur Verbesserung der Endothelqualität beitragen und entnahme- sowie kulturvierungsbedingte Endothelzellverluste kompensieren sind anzustreben. Die korneale Endothelzell-dichte ist entscheidend für die Funktion der Hornhaut sowohl in situ als auch im Transplantat und daher dessen Erhalt von größter Wichtigkeit (12). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass oxidativer Stress und somit die Rate der Zellschädigung in Zellkulturen von Spendern signifikant erhöht ist. Auf der Suche nach präventiven Strategien gegen Augenkrankheiten stellen antioxidative wirkende Polyphenole einen wichtigen therapeutischen Ansatz dar. Eines der bekanntesten Polyphenole ist Resveratrol (RSV), was bereits seit Jahren im Focus wissenschaftlicher Studien steht. RSV wurde bereits früh in der Medizin entdeckt und ist dank der Veröffentlichung von Frankel et al. aus dem Jahr 1993 durch seine hemmende Wirkung auf die Oxidation von Lipoproteinen (13) allgemein bekannt. RSV weist eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Wirkungen auf. Das „Französische Paradoxon“ beschreibt die geringere Mortalität durch koronare Herzkrankheiten in Südfrankreich und spricht RSV somit positive kardiovaskuläre Effekte bei mäßigem Rotweinkonsum zu (14, 15). In onkologischen Studien zeigte RSV antioxidative und antiapoptotische Wirkungen bei Tumoren (16) und auch in Studien zu Alzheimer wurde RSV neuroprotektive und antiinflammatorische Effekte beschrieben (17, 18). In einem Studienmodell zu oxidativem Stress durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid führte RSV über verschiedenste Signalwege und Kaskaden zur Reduktion des H₂O₂-induzierten Zelltodes. Der genaue Wirkmechanismus von Resveratrol ist aktuell noch nicht bekannt und scheint zwischen den unterschiedlichen Zellen und Geweben zu variieren.

Sehbehinderung ist aufgrund einer alternden Weltbevölkerung ein zunehmendes globales Gesundheitsproblem und daher die Suche nach therapeutischen Strategien ein wichtiges Thema. Aufgrund seiner vielfältigen positiven Eigenschaften bietet RSV einen

vielversprechenden Ansatz als medikamentöse Präventionsstrategie zur Reduzierung von oxidativem Stress im kornealen Endothel dar. Die vorliegende Dissertation konzentriert sich auf die Anwendung von RSV in Hornhauttransplantaten und dessen Wirkung auf korneale Endothelzellen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Kornea

2.1.1 Funktion und Aufbau der Kornea

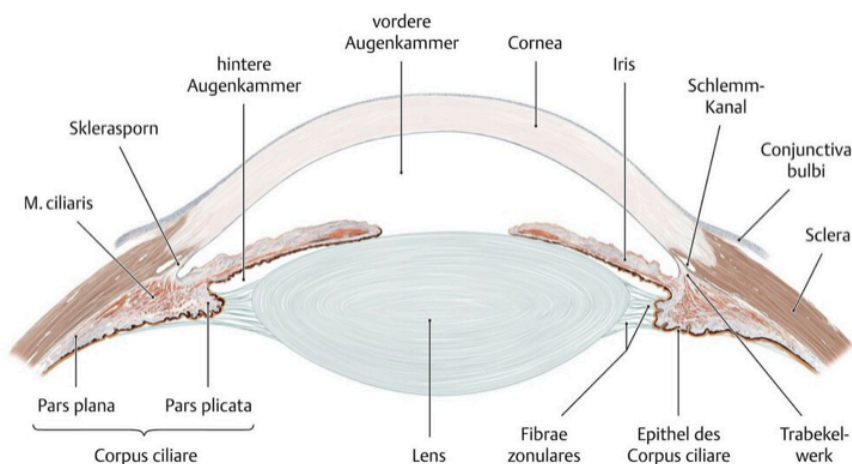
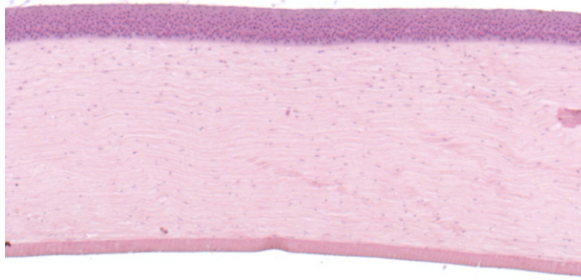


Abbildung 1: Anatomischer Schnitt durch die Hornhaut sowie durch die Linse und ihren Halteapparat (1)

Für unser Sehen ist die Hornhaut in ihrer Funktion als „Frontlinse“ des Auges von unersetzlicher Bedeutung. Vergleichbar mit einem Uhrglas in einer Uhr ist die Hornhaut in die schwächer gekrümmte Sklera (Lederhaut) eingebettet. Zusammen mit der Sklera begrenzt sie das Auge nach außen.

Die Kornea stellt eine funktionelle Einheit dar, die auf Transparenz und mechanische Festigkeit konstruiert ist. An ihrem Aufbau beteiligen sich verschiedene Gewebetypen: Epithel, Endothel und Bindegewebe, die einen hochorganisierten Gewebeverband darstellen, um die Vielfalt ihrer Aufgaben und Funktionen ausüben zu können. Die Kornea nimmt eine wichtige Funktion in der Weiterleitung von Lichtreizen und der Refraktion (Lichtbrechung) ein. Ihre Transparenz, die durch den besonderen histologischen Aufbau und das Fehlen von Blutgefäßen bedingt ist, ermöglicht das Einfallen von Lichtreizen ins Augeninnere (19). Die Kornea gehört zum dioptrischen Apparat des Auges und übernimmt mit 43 Dioptrien (dpt) einen erheblichen Anteil an der Gesamtbrechkraft sowie eine wichtige Voraussetzung für scharfes Sehen. Zudem stellt die Kornea eine mechanische Barriere gegen schädliche äußere Einwirkungen wie Verletzungen, Infektionen und Austrocknung dar (20).

Histologisch kann die Kornea, wie in Abbildung zwei dargestellt, in fünf Schichten unterteilt werden.



1. Epithel mit der Basalmembran
2. Bowman-Membran
3. Stroma
4. Descemet- Membran
5. Endothel

Abbildung 2: Histologischer Aufbau der Kornea (21)

Die Kornea ist streng fünfschichtig aufgebaut. Der Tränenfilm, ein 30 µm dicker Flüssigkeitsfilm aus Lipiden und Muzinen, begrenzt das Auge nach außen. Die innerste Endothelschicht grenzt die Kornea gegen die vordere Augenkammer ab. Die Dicke der zentralen Hornhaut beträgt etwa 550 µm, wovon 90% auf das Stroma entfallen.

1. Die äußerste konvexe Hornhautepithelschicht besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel, das Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen enthält. Die flachen oberflächlichen Zellen bilden durch *Tight Junctions* eine Diffusionsbarriere gegenüber der Tränenflüssigkeit. Das Epithel fungiert als Barriere gegen Krankheitskeime, bietet mechanischen Schutz und beteiligt sich an der Regulation des Wassergehalts im Korneastroma. Es wird von der Basalzellschicht aus innerhalb von sieben Tagen erneuert, weshalb Epitheldefekte rasche und ohne Narbenbildung abheilen. Das Epithel gehört zu den empfindlichsten Oberflächen des Körpers und ist reich an freien Nervenendigungen des *Nervus ophthalmicus*, die für die ausgeprägten Schutzmechanismen des Auges (Lidschlussreflex) verantwortlich sind (22-24).
2. Die Bowman-Membran, auch als *Lamina limitans anterior* bezeichnet, ist etwa 10 bis 20 µm dick, besteht aus dünnem, unregelmäßig angeordnetem Kollagenfibrillen sowie Proteoglykanen und ist mit der Basalmembran des Hornhautepithels verbunden (25). Die Bowman-Membran ist für die Erhaltung der Epithelstruktur essenziell. Sie besitzt keine biologische Regenerationsfähigkeit und verheilt bei Verletzung nur unter Narbenbildung.
3. Das Stroma besteht im Wesentlichen aus länglichen, verzweigten Keratozyten, welche die extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und Wasser produzieren (26). Mehrere hundert regelmäßig angeordnete Kollagenfibrillen sind in Lamellen organisiert, die wiederum eine oberflächenparallele Anordnung aufweisen. Die Kollagenfibrillen weisen einen geringeren Abstand (30 nm) als die sichtbare Wellenlänge des Lichtes auf, was zur Minimierung der Lichtstreuung im Stroma führt und die Transparenz der Hornhaut ermöglicht. Wassereinlagerungen zwischen die

Kollagenfibrillen erhöhen deren Abstand und führen zu einer unregelmäßigen Fibrillenordnung, das wiederum Einbußen der kornealen Transparenz nach sich zieht (27).

4. Die Descemet-Membran bzw. *Lamina limitans posterior* besteht aus Kollagen Typ VIII und Laminin, ist durchsichtig und homogen. Die Membran ist die dickste Basalmembran des menschlichen Körpers und damit ausgesprochen elastisch und verletzungsresistent (22).

Den inneren Abschluss bildet eine einreihige, lückenlose Lage Endothel.

2.1.2 Das korneale Endothel

Das menschliche Hornhautendothel ist physiologisch die wichtigste Monoschicht der Hornhaut. Es begrenzt als innenliegende Schicht den strukturierten Gewebeaufbau der Kornea zur Vorderkammer (vgl. Abb. 2) und weist eine charakteristische hexagonale Zellmorphologie auf, die durch ausgeprägte *Tight junctions* verknüpft ist, um eine wirksame Diffusionsbarriere gegenüber der mit Kammerwasser gefüllten Augenvorderkammer zu schaffen. Als die stoffwechselaktivsten Zellen der Hornhaut, besitzen sie kontinuierlich arbeitende Flüssigkeitspumpen, die Flüssigkeit aktiv aus dem Stroma zurück in die vordere Augenkammer befördern. Korneales Stroma kann aufgrund der Glykosaminoglykan-Zusammensetzung große Flüssigkeitsmengen adsorbieren, wodurch eine ödematöse Hornhaut entsteht (28). Das dynamische Gleichgewicht zwischen der „undichten Barriere“ und den aktiven Flüssigkeitspumpen reguliert die Hydratation der Hornhaut und hält diese transparent (29). Zugleich ist das Endothel die Hornhautzellschicht mit der niedrigsten mitotischen Aktivität und nur bedingt regenerationsfähig. Eine Schädigung des Endothels ist daher klinisch und funktionell bedeutsamer als eine Schädigung anderer Hornhautschichten, da dies zu irreversiblen Zellverlust und Störung der Seh- und Hornhautfunktion führen kann (30). Die Ernährung der Kornea erfolgt durch Diffusion aus drei Richtungen: von hinten aus dem Kammerwasser, von der Peripherie aus den konjunktivalen Blutgefäßschlingen am Limbus und von vorn aus dem Tränenfilm.

Im Laufe der Zeit erleidet das korneale Endothel einen physiologischen Zellverlust von ca. 0,6% jährlich (31, 32). Erkrankungen und Operationen können den Verlust weiter steigern, sodass eine Gewebetransplantation notwendig werden kann. Zellverluste in der Endothelzellschicht werden durch eine kompensatorische Hypertrophie der verbleibenden Zellen ausgeglichen, um so das Eindringen von Kammerwasser ins Stroma zu verhindern und die korneale Transparenz aufrechtzuerhalten. Die Hauptfunktion stellt folglich die ständige Dehydratation des kornealen Stromas dar, um die Transparenz der Kornea über eine konstante Stromadicke zu gewährleisten und somit die Sehfähigkeit zu erhalten. Es besteht

eine umgekehrte Beziehung zwischen dem Alter und der Dichte der Hornhautendothelzellen (*Corneal endothelial cells* [CEC]) (33). Die CEC-Dichte von drei- bis sechsjährigen Kindern beträgt 4000 bis 3500 Zellen/mm². Für Erwachsene mittleren Alters (30 Jahre) wird sie mit bis zu 3000 Zellen/mm² angegeben und nimmt im Alter weiter ab. Im Alter von 80 Jahren wird oft nur noch eine Endothelzellendichte von 1000-2000 Zellen/mm² gemessen (34, 35). Als Folge der Zellabnahme weisen die Endothelzellen einen zunehmenden Pleomorphismus (Variabilität der Zellform) und Polymegatismus (Variabilität der Zellgröße) auf. Fällt die CEC-Dichte unter einen kritischen Schwellenwert von 500-1000 Zellen/mm² kommt es zu einer endothelialen Dekompensation und einer Barriereninsuffizienz, die mit progredienter Stromaödembildung verbunden ist und mit Eintrübung der Hornhaut einhergeht (36). Der Verlust der Funktion des Hornhautendothels führt bei den Patienten zu einem Verlust der Sehschärfe und schließlich zur Hornhautblindheit. Die Behandlung zur Wiederherstellung des Sehvermögens bei derartigen Endothelzellverlusten besteht einzig darin, dass ineffektive Endothel durch gesundes funktionsfähiges Spender-Hornhautendothel durch eine Keratoplastik zu ersetzen.

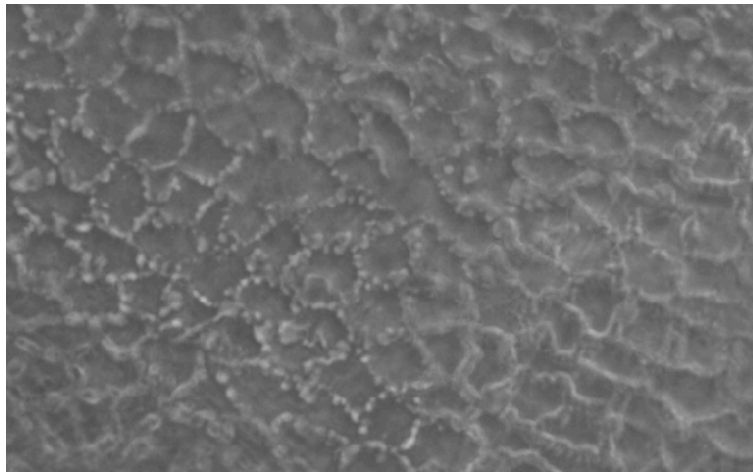


Abbildung 3: Mikroskopische Darstellung des kornealen Endothels. Sichtbar wird ein Mosaik aus Endothelzellen, die sich sowohl in der tetra- bis hexagonalen Morphologie als auch in der Zellgröße unterscheiden.

2.2 Hornhauttransplantation

Die erste klassische Hornhautübertragung wurde 1905 vom österreichischen Augenarzt Eduard Zirm erfolgreich durchgeführt und hat damit die Augenchirurgie revolutioniert. Die Hornhauttransplantation, eine sogenannte Keratoplastik, ist ein invasiver ophthalmologischer Eingriff, bei dem die erkrankte Hornhaut durch eine allogene gesunde Spenderhornhaut zur Wiederherstellung der optischen Funktion des Auges ersetzt wird (37). Je nach Indikation zur Keratoplastik wird diese in verschiedenen chirurgischen Verfahren durchgeführt und unterschiedliche Gewebeabschnitte der Kornea transplantiert.



Abbildung 4: Eduard Zirm

Bundesweit benötigen tausende Menschen jährlich eine neue Kornea, um ihre Sehfähigkeit nach einem Unfall oder der Manifestation angeborener oder degenerativer Erkrankungen wiederherzustellen. Rund 7000 Hornhauttransplantationen werden jährlich in Deutschland durchgeführt und es gibt deutschlandweit aktuell 27 Hornhautbanken, in denen die Spendergewebe auf Qualität geprüft, typisiert und konserviert werden. Die Anzahl der Hornhauttransplantationen nahm über die vergangenen Jahre immens zu, doch parallel zu den steigenden Transplantationszahlen stieg auch die Nachfrage an geeigneten Hornhautspenden, sodass immer noch ein Versorgungsengpass und eine damit verbundene Wartezeit besteht. So waren im Jahr 2011 noch etwa 1892 Patienten auf der Warteliste, 2013 bereits 3163 und 2018 5313 Patienten. Im Schnitt muss ein Patient acht bis neun Wochen auf eine Hornhauttransplantation warten (38). Die Hornhauttransplantation stellt die mit Abstand häufigste Transplantation humanen Gewebes dar. Die Erfolgsrate von Hornhauttransplantationen liegt bei durchschnittlich 80% und ist damit die erfolgreichste Transplantationsmethode, mit der geringsten Abstoßungsrate (39). Das durchschnittliche Empfängeralter betrug 67 Jahre (40).

2.2.1 Kriterien zur Spende, Entnahme und Transplantation

Das Transplantationsgesetz (TPG) regelt seit 1997 in der Bundesrepublik Deutschland die rechtlichen Voraussetzungen für die Spende, Entnahme und Übertragung von menschlichen Organen und Organteilen sowie Geweben. Die Hornhaut zählt nach dem TPG zu den Geweben, das Spende und Transplantation in Deutschland seit 2007 verabschiedete Gewebegesetz regelt, darin ist durch differenzierte Vorschriften auf die Besonderheiten der Gewebeprodukte eingegangen wurden. Es dürfen Hornhäute nur von einem Spender gewonnen werden, der zu Lebzeiten eine Einwilligung zur Gewebespende erteilt hat oder dessen Angehörige nach seinem Tod dieser zugestimmt haben (41). Darüber hinaus muss der

Tod des Gewebespenders der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Feststellung des irreversiblen Hirnfunktionsausfalls entsprechend festgestellt werden. Die an den Untersuchungen zur Todesfeststellung beteiligten Ärzte dürfen gemäß § 5 Abs. 2 TPG weder an der Entnahme noch an der Übertragung der Gewebe des Spenders beteiligt sein und nicht Weisungen eines Arztes unterstehen, der an diesen Maßnahmen beteiligt ist. Die Hornhaut des Auges kann postmortal im Rahmen einer Organspende aber auch unabhängig von einer Organspende gewonnen werden. Eine obere Altersgrenze für die Hornhautspende ist gesetzlich nicht festgelegt (42). Die Spenderfeststellung sowie die Gewinnung, Konservierung und Abgabe von Augenhornhauttransplantaten müssen in Zusammenarbeit mit einer Augenhornhautbank erfolgen, die über eine Erlaubnis zur Gewinnung von Gewebe bzw. zur Gewinnung von Augenhornhauttransplantaten gemäß § 20b AMG sowie eine Erlaubnis für die Be- und Verarbeitung, Konservierung, Prüfung, Lagerung sowie das Inverkehrbringen von Augenhornhauttransplantaten gemäß § 20c AMG verfügt (43). Die Hornhauttransplantatentnahme kann in Deutschland bis 72 Stunden postmortal erfolgen. Entscheidend hierfür ist jedoch das Vorhandensein einer Spenderblutprobe (Blut/Plasma) für ein serologisches Screening und ggf. eine HLA-Typisierung. Das Screeninglabor sollte entweder noch zu Lebzeiten oder innerhalb der ersten 24 Stunden postmortal entnommen werden und dient dem Ausschluss übertragbarer Infektionskrankheiten (42). Das Spenderscreening umfasst Testungen auf HBV, HCV, HIV und Syphilis. Aus Gründen des Empfängerschutzes ist bei bestimmten Erkrankungen oder Infektionen eine Hornhautspende nicht möglich. Unter anderem zählen maligne Blutzellerkrankungen, Tumore der Augen, ZNS Erkrankungen unklarer Genese, systemische Infektion durch multiresistente Keime oder Pilze, klinisch manifeste Syphilis, Borreliose, Masern, Röteln, Tollwut, Meningitis/Enzephalitis, erhöhtes Hepatitis B/C und HIV - Risiko bei aktivem Drogenabusus dazu. Weitere Ausschlusskriterien zur Hornhautspende sind keine Angehörigen, kein Spenderausweis oder eine unklare Todesursache.

Nach Entnahme der Sklerokornealscheibe (in 95 % der Spenden), wird diese in speziellen Transportmedium für die weitere Prozessierung in die Hornhautbank gebracht. Für die Kultivierung von Spenderhornhäuten muss jede Hornhautbank definierte Kultivierungsbedingungen einhalten, was wesentlich für die Gewährleistung der Qualität und Sicherheit der Spenderhornhaut ist. Dort wird unter sterilen Bedingungen die Hornhautspende in ein Kulturmedium umgesetzt und unter standardisierten Sicherheitsauflagen konserviert. Die Hornhautbank übernimmt die Verwaltung der Hornhäute, die Koordination von Spender- und Empfängereigenschaften sowie die individuelle Zuteilung der Hornhauttransplantate zu den gemeldeten Empfängern. Faktoren, wie das Empfängeralter, die ophthalmologische Grunderkrankung, die Dringlichkeit der Operation sowie das Risiko einer Abstoßungsreaktion sind mit einflussnehmend. Da Hornhauttransplantate im Brutschrank bis zu 4 Wochen konserviert werden können, besteht ein großes Zeitfenster, das erlaubt einen geeigneten

Empfänger zu finden und die Operation zu planen. Für Notfalloperationen, z.B. bei einer perforierenden Verletzung oder Ulcera hält die Hornhautbank (HHB) vereinzelte Transplantate parat. Um die Vergabe von Transplantaten zu optimieren, arbeiten die meisten HHB auf nationaler und internationaler Ebene zusammen sowie mit Institutionen wie die *European Eye Bank Association* (EEBA) und der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG).

2.2.2 Die Keratoplastik - Indikation und operative Verfahren

Die Indikation zur Hornhauttransplantation wird anhand verschiedener ätiologischer Veränderungen der Hornhaut, die die Sehschärfe und das morphologische Bild beeinträchtigen, gestellt. Tektonische Indikationen sind Hornhautdefekte, wie beispielsweise Hornhautverdünnungen, -perforationen, -narben, bei denen eine Keratoplastik die Integrität und normale Struktur der Kornea wiederherstellt. Optische Indikationen sind Hornhauttrübungen oder Wölbungsanomalien, wie Hornhautdystrophien, Keratokonus, Keratitiden etc., die unbehandelt zu einer schweren Sehbehinderung führen. Die weltweit häufigsten Indikationen die zu einer Keratoplastik führen sind Fuchs Endotheldystrophie mit 39%, Keratokonus (27%) und infektiöse Keratitis (20%) (4). Deutschland individuell betrachtet führen in absteigender Reihenfolge die Fuchs Endotheldystrophie, die Re-Keratoplastik und die Endotheldekompensation (38) zur Indikationsstellung.

Je nach zugrundeliegender kornealer Erkrankung wird in der Augenheilkunde die perforierende oder die lamelläre Keratoplastik angewendet.

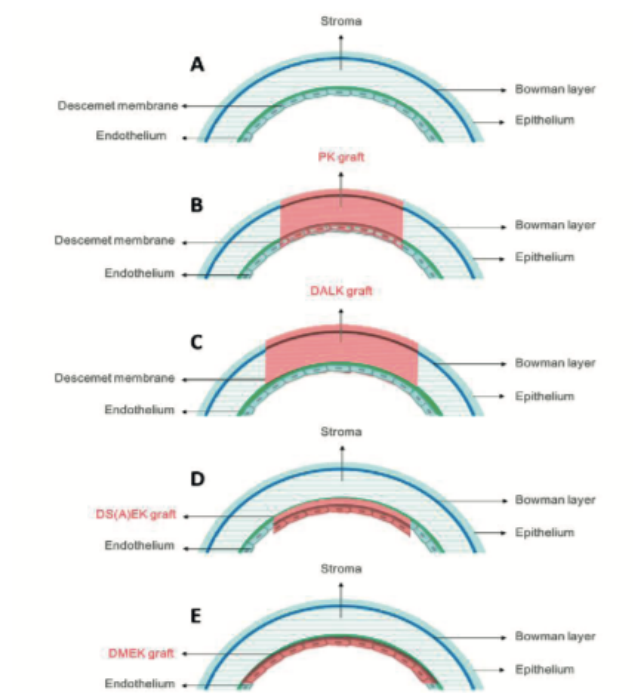


Abbildung 5: Formen der Keratoplastik (43)

Bei der perforierenden Keratoplastik (pKP) wird die Hornhaut in ihrer gesamten Dicke transplantiert. Folglich wird ein kleines, alle Hornhautschichten (Epithel, Stroma und Endothel) umfassendes Gewebescheibchen mit einem Rundmesser oder Laser aus der Hornhaut präpariert und durch eine klare Spenderhornhaut ersetzt. Das Korneatransplantat wird mittels Nähten fixiert. Indikationen für eine perforierende Keratoplastik sind unter anderem Hornhauttrübungen, -narben, Perforationen, Ulzera sowie ein fortgeschrittener Keratokonus.

Dank technischer Innovation sind in den letzten Jahren für einige Indikationen weniger invasive Techniken entwickelt worden: die *lamellären Keratoplastiken*, bei denen lediglich die erkrankten Hornhautschichten ausgetauscht werden. Die lamellären Keratoplastiken werden unterteilt in *anteriore* bzw. *posteriore lamelläre Keratoplastiken*.

Bei den *posterioren lamellären* Techniken sind es die hinteren Schichten der Hornhaut, die Descementmembran und das Endothel (DMEK) oder zusätzlich ein Teil des hinteren Stromas (DSAEK) (44) die transplantiert werden. Diese Methoden eignen sich für Patienten mit kornealer Endothelzellinsuffizienz, die bei Erkrankungen wie der Fuchs'schen Endotheldystrophie, der bullösen Keratopathie oder Endothelversagen nach Hornhauttransplantation auftritt. Das hauchdünne Spendergewebe wird bei minimaler Inzision nach Abtragen der erkrankten Gewebeschicht in die Augenvorderkammer gebracht und durch eine Gastamponade nahtfrei an der Rückfläche der Wirtshornhaut angeheftet. In welchen Fällen eine DMEK oder eine DSAEK durchgeführt wird, ist abhängig von der Grunderkrankung, dem Patientenalter, den anatomischen Verhältnissen sowie der Erfahrung des Operateurs. Derzeit ist die DSAEK die weltweit verbreitete Technik der posterioren lamellären Keratoplastiken (45). Die vordere lamelläre Keratoplastik als „*Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*“ (DALK) findet beim Keratokonus oder bei Hornhautnarben im Bereich des vorderen Hornhautschichten Anwendung, ist jedoch noch kein Standardverfahren, um die perforierende Keratoplastik bei Erkrankungen des Hornhautstromas abzulösen (45).

Abstoßungsreaktionen, Eintrübungen und hoher Astigmatismus gehören zu den potenziellen Komplikationen der *perforierenden Keratoplastik*. Primäres Transplantatversagen, Transplantatdislokation und Abstoßungsreaktion sind die häufigsten Komplikationen bei der weniger invasiven *lamellären Keratoplastik*.

2.2.3 Erfolg und Probleme der Hornhauttransplantation

Hornhauttransplantationen sind die erfolgreichsten und häufigsten Transplantationen von festem Gewebe. Es wurde eine Vielzahl an Studien zu Transplantatüberleben nach Keratoplastik durchgeführt, mit den Ergebnissen, dass die 5-Jahres-Überlebensraten für alle Transplantate 97,4 % bis 72 % (46-49) betrug, jedoch mit signifikant verringerten

Überlebensraten bei entzündlichen ophthalmologischen Vorerkrankungen. Auch initiale Re-Transplantate hatten signifikant niedrigere 5-Jahresüberlebensraten (53 %). Die 10-Jahres-Überlebensrate unterliegt größeren Schwankungen und reicht von 40 % bis 90 %, wobei auch hier die Transplantationsindikation, okuläre Komorbiditäten und anderen Faktoren (40, 50) eine entscheidende Rolle spielen. Die höchsten 5- und 10-Jahres-Überlebensraten wurden bei primären Transplantaten für Augen mit der präoperativen Diagnose: Keratokonus (97 % und 92 %) oder Fuchs-Dystrophie (97 % und 90 %) festgestellt (51).

Bei den Misserfolgen muss zwischen einem primären und sekundären Transplantatversagen unterschieden werden. Ein primäres Transplantatversagen tritt bei etwa 10 % der Keratoplastiken auf (52) und ist definiert als das Vorhandensein eines postoperativen diffusen kornealen Stromaödems sowie das nicht Wiederaufklaren der Hornhaut aufgrund einer ungenügenden Endothelfunktion oder eines Transplantatversagen aufgrund von Transplantatablösung (53). Ein primäres Transplantatversagen kann infolge ungesunden Spenderendothels, intraokulären Entzündungen, unzureichender Gewebeerhaltung und Endothelzellverlust nach operativem oder entnahmebedingtem Trauma auftreten, wird jedoch heute dank sorgfältiger Augenbanken-Methoden und verbesserter Operationstechniken immer seltener.

Das sekundäre Transplantatversagen unterscheidet sich vom primären darin, dass die Hornhaut zunächst aufklart und eine Visusverbesserung eintritt. Im späteren Verlauf kommt es, oft auch erst Jahre später, zu einem Verlust der Endothelzellfunktion und folgend zu einem Stromaödem mit Visusminderung.

Die Ursachen für ein sekundäres Transplantatversagen sind ebenso vielfältig. In verschiedenen Studien (54, 55), unter anderem in einer großen Studie zu Langzeitüberleben von Transplantaten nach PKP haben Price et al. (51) gezeigt, dass Endothelversagen infolge endothelialer Dekompensation (25 %), immunologischer Allotransplantatabstoßung (27 %) und Oberflächenkomplikationen (18 %) entstehen.

Ein hoher Endothelzellverlust ist früh postoperativ innerhalb der ersten 6 Monate zu verzeichnen, dem ein chronischer Endothelzellverlust von etwa 7 % jährlich folgt. William Bourne und seine Studiengruppe zeigten, dass die Endothelzahl, ohne Ereignis einer Abstoßungsreaktion, nach etwa 15 Jahren post-transplant um 70 % geringer war und es dadurch zu einem spätem Transplantatversagen kommen kann (56). Ähnliche Ergebnisse erzielte die Auswertung einer französischen Kohorten-Studie an der Universität Paris, in der das Transplantatüberleben anhand der kornealen Endothelzellichte nach Keratoplastik untersucht wurde. Die durchschnittliche Endothelzellichte betrug 2270 Zellen/mm² vor der Operation, 1604 Zellen/mm² (- 29,7 % Zellverlust) ein Jahr postoperativ, 1321 Zellen/mm² (- 42,4 %) im 3. postoperativen Jahr, 1058 Zellen/mm² (- 52,7 %) im 5. postoperativem und 865

Zellen/mm² (- 61 %) im 10. postoperativen Jahr. Insgesamt betrug die prognostizierte Transplantatüberlebensschätzung 27 % nach 20 Jahren und 2 % nach 30 Jahren. Eine größere anfängliche Zelldichte war mit einer längeren vorhergesagten Zeit bis zum Transplantatversagen verbunden (48). Durch Alterungsprozesse und Abnahme der Endothelzellzahl in transplantierten Hornhäuten kommt es zu einer herabgesetzten Pumpaktivität der verminderten Endothelzellen und folgend zu einer Verdickung dieser, als Ergebnis einer verminderten Endothelfunktion (29, 57, 58). Wenn sich die Endothelfunktion weiter verschlechtert, können die Transplantate einen Zustand entwickeln, der als spätes Endothelversagen bezeichnet wird, durch anhaltende Schwellung und Trübung des Transplantats gekennzeichnet ist und nicht auf Kortikosteroide anspricht (59). Unterschiedliche Abstoßungsraten wurden auch nach den verschiedenen operativen Verfahren beobachtet, innerhalb von zwei Jahren post-transplant liegt das Abstoßungsrisiko nach PKP bei 0-23 %, nach DSAEK bei 0-14 % und nach DMEK bei 1-3 % (60-63).

Ein Grund für die im Vergleich zu anderen Gewebetransplantationen niedrigere Inzidenz einer immunologischen Abstoßungsreaktion bei Keratoplastiken ist das okuläre Immunprivileg der Kornea. Das Fehlen von Blut- und Lymphgefäßen, eine reduzierte Anzahl antigenpräsentierender Abwehrzellen sowie lokale immunsuppressive Moleküle sind ursächlich für das „immunologische Privileg“ der Hornhaut (64, 65). Es ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus, um für Entzündungsarmut und damit Transparenz in der Hornhaut zu sorgen. Folglich besteht eine eingeschränkte Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf Fremd-Antigene in der Kornea und der Augenvorderkammer, weshalb bei der Hornhauttransplantation auf ein HLA-Matching und eine systemische Immunsuppression in der Regel verzichtet werden kann. In der großangelegten randomisierten FANCY-Studie konnte kein günstiger Effekt für HLA-Matching nachgewiesen werden (66, 67). Ist die Hornhaut jedoch infolge einer Verätzung oder infektiösen Entzündung pathologisch vaskularisiert, sinkt die Erfolgsrate auf 40-50 % innerhalb der ersten 36 Monate (9).

Immunreaktionen im Transplantat können die einzelnen Hornhautschichten isoliert befallen, häufig dabei ist jedoch das nicht regenerationsfähige Endothel betroffen, was das Überleben des Transplantats ausmacht. Ein Transplantatversagen aufgrund einer endothelialen Transplantatreaktion (TPR) äußert sich klinisch mit einer irreversiblen Hornhauttrübung und Visusverlust. Es tritt eine immunologische Reaktion gegen Hornhautendothelzellen auf, das zu Endothelzellverlust, im Verlauf fortschreitend zu einer Endothelinsuffizienz und einem Stromaödem führt. Bei der endothelialen TPR wird eine akut diffuse von einer chronischen Reaktion unterschieden. Bei der akut diffusen Abstoßungsreaktion kommt es zu einem generalisierten Hornhautödem, Zellen und dem Tyndall-Effekt in der Vorderkammer sowie diffusen Präzipitaten an der Hornhaurückfläche. Bei der chronisch fokalen Abstoßungsreaktion tritt ein segmentales Transplantatödem und eine endotheliale

Khodadoust-Linie auf, außerdem kommt es zur typischerweise geringeren Reizung der Augenvorderkammer (68, 69). Die sofortige Diagnose einer immunologischen Abstoßung und die Behandlung mit Kortikosteroiden können helfen das Überleben des Transplantates zu verlängern (70). Der Goldstandard zur Diagnose einer immunologischen Abstoßung ist die Spaltlampenuntersuchung, in der nach Hinweisen auf eine endotheliale Abstoßungslinie, keratische Präzipitate, stromale Infiltrate, Zellen in der Vorderkammer oder eine Zilieninjektion in ein zuvor klares Transplantat gesucht wird. Der Vollständigkeit genant gibt es noch epitheliale und stromale TPR, welche aufgrund ihres seltenen Auftretens und der fehlenden Beeinträchtigung des Visus jedoch eine untergeordnete Rolle spielen und daher an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden.

2.2.4 Kultivierung der Hornhaut

Standardisierte Kultivierungstechniken sind notwendig, um die vorgeschriebenen Qualitätskriterien einzuhalten und Kontaminationen sowie Schädigungen der Hornhautspende zu verhindern. Bevor die HH in Kultur genommen wird, wird diese auf makroskopische Unversehrtheit und korrekte Entnahme- und Transportbedingungen hin kontrolliert. Anschließend erfolgt die Lagerung. In den europäischen Hornhautbanken und den USA werden verschiedene Methoden zur Lagerung humaner Hornhautspenden bevorzugt. Hierzulande erfolgt die Gewebekultivierung in einem geschlossenen System im Brutschrank bei 31-37°C für maximal 28 Tage. Die Hornhaut verbleibt in einem speziellen Nährmedium (M1), das in regelmäßigen Abständen erneuert wird. Während der Lagerung in M1 wird entsprechend des initialen Volumens ein Mediumwechsel alle 3 bis 10 Tage bis zum Ablauf der Haltbarkeit durchgeführt (41), da die im M1 enthaltenen Aminosäuren, Vitamine und Elektrolyte verstoffwechselt werden. Der erste Medienwechsel steht in aller Regel nach 7 Tagen an. Das Hornhauttransplantat kann frühestens am 10. Postentnahmetag transplantiert werden, da die entnommene Hornhaut erstmal in „Quarantäne“ muss und auf Kontamination überprüft wird. Dafür wird das Kulturmedium regelmäßig makroskopisch auf Anzeichen einer Kontamination, wie Änderung der Indikatorfarbe oder Ablagerungen in der Flasche untersucht. Die Sklerokornealscheibe wird in durchsichtigen Gefäßen gelagert, sodass optisch jederzeit ein Farbumschlag sichtbar ist. Zusätzlich erfolgt eine mikrobiologische Untersuchung des Kulturmediums auf Pilze und Keime. Die mikrobiologische Sterilitätskontrolle erfolgt zum Zeitpunkt des ersten Mediumwechsels, außerdem findet eine erste mikroskopische Endothelevaluierung statt. Bei Anforderung des Transplantats muss diese dann für mindestens 24 Stunden in ein Entquellungsmedium (M2) überführt werden, da die Hornhäute während der Organkultur nicht unerhebliche Mengen Wasser aufnehmen und anschwellen. Die normale Dicke der Hornhaut beträgt ca. 0,5 mm, während der Kultur werden hingegen Werte bis zu 0,9 mm erreicht. Diese Entquellung wird zurzeit in allen europäischen HHB durch

einen Zusatz von Dextran 500 zum Kulturmedium durchgeführt. Die Höchstdauer für die Gewebekultivierung der Hornhaut beträgt 34 Tage, einschließlich der Lagerung in (M2), welche 6 Tage nicht überschreiten sollte. Studien haben gezeigt, dass die Entquellung in Dextran zu einer Verschlechterung des energieliefernden Stoffwechsels der Hornhaut führt (71). Dextran ist eine hyperosmolare Substanz und verhindert die Stromaquellung. Um eine Entquellung zu erzielen, werden auch humane Korneoskleralscheiben nach der Inkubation in Organkultur in dextranshaltigem Medium gelagert, allerdings nur für eine kurze Zeitspanne vor der Keratoplastik, um mögliche toxische Auswirkungen des Dextrans zu reduzieren (72). In Studien wurde festgestellt, dass Dextran die Regenerationsfähigkeit negativ beeinflusst und deshalb bei vorgeschädigtem Endothel zu Endothelzellverlusten führt (73). Ebenfalls konnten im Elektronenmikroskop intrazelluläre Dextran-Einlagerungen in Endothelzellen und Keratozyten der Kornea beobachtet werden (74, 75), so dass eine längerfristige Kultivierung in dextranshaltigem Medium nach aktuellen Qualitätsstandards nicht erfolgt.

Ziel der Kultivierung entnommener Spenderhornhäute ist es, ausreichend Zeit zur Verfügung zu haben, um den Operationszeitpunkt optimal zu planen, ggf. eine zeitaufwendige HLA-Typisierung durchzuführen und die Gefahr der Keimübertragung zu minimieren. Längere Lagerungszeit bietet die Möglichkeit Keimwachstum zu beobachten und ggf. die Aussonderung der Transplantate bei Verunreinigung (76). Zudem hilft es die Endothelvitalität und -qualität verlässlich abzuschätzen. Zudem unterliegt die Keratoplastik den gesetzlichen Qualitätssicherungsvorschriften des Transplantationsgesetzes. Um diese Anforderungen bestens zu erfüllen, ist die Langzeitkultivierung weiterhin die Methode der Wahl.

Die Methode der Gewebekultivierung von Korneoskleralscheiben bei 31°C bis 37°C wurde 1973/74 zuerst von *Summerlin* beschrieben und in den folgenden Jahren von *Doughman* in den USA (1976) (77), *Sperling* (1979) (78) und von *Böhnke* (1984 und 1991) (75, 79) in Europa modifiziert. Die Weiterentwicklung der Hornhautkultivierung machte eine vierwöchige Lagerung der Hornhäute möglich. Die Kultivierungsmethode wurde in dem Sinne modifiziert, dass die biologischen Prozesse und Zellfunktionen fortgeführt werden und die Regeneration von Defekten unterstützt. Schäden, die aufgrund von Abkühlung der Hornhaut auf 4°C, wie bei einer hypothermen Lagerung entstehen können, werden vermieden. Bei Kurzzeitkonservierung in einem entquellenden Organkulturmedium bei +4°C beträgt die Lagerungshöchstdauer maximal 14 Tage. Der Vorteil der hypothermen Kurzzeitkultur, wie sie überwiegend in den USA angewendet wird, liegt in der einfachen Handhabung. Der schwerwiegendste Nachteil ist die ungenügende Wirksamkeit der zugesetzten Antibiotika sowie ein mangelhaftes Keimwachstum, mit der Gefahr der Keimübertragung. Umgekehrt birgt die Gewebekultivierung bei 37°C jedoch die Gefahr der Kontamination aufgrund eines optimalen Milieus für Keimbesiedlung. Um der Kontaminationsgefahr entgegenzuwirken, werden dem Kultivierungsmedium Antibiotika und Antimykotika zugegeben. Aktuell befassen

sich weitere Studien damit, die Organkultivierung in unterschiedlichen Ansätzen zu optimieren, um die Gewebequalität als auch die Verwendungsrate zu steigern. Im Kapitel 1.8.1 ist die genaue Zusammensetzung der Kulturmedien beschrieben.



Abbildung 6: Organ kultivierte Korneoskleralscheiben im Brutschrank bei 34 °C. Jede Hornhaut ist in einer speziellen Halterung aufgehängt und wird in einem durchsichtigen Gefäß gelagert.

2.2.5 Anforderungen Hornhauttransplantat und Endothelevaluierung

Die Keratoplastik unterliegt den gesetzlichen Qualitätssicherungsvorschriften des Transplantationsgesetzes. Die Hornhautspende muss nach Entnahme verschiedene Qualitätskontrollen durchlaufen, bevor diese zur Transplantation freigegeben werden kann. Dazu gehört zum einen der Nachweis einer negativen Infektionsserologie des Spenders (siehe Kapitel 3.2.1 – Kriterien zur Transplantation) und zum anderen unauffällige mikrobiologische Proben des Kultivierungsmediums auf Kontamination durch Bakterien oder Pilze (80). Die Hornhaut selbst wird mikroskopisch auf ihre Vitalität hin untersucht, dabei steht die Endothelzellschicht im Vordergrund. Als Hauptqualitätsmerkmal wird die Endothelzelldichte, die in Zellen/mm² angegeben wird und mindestens 2000 Zellen/mm² betragen sollte, herangezogen. Die Zellzahl ist entscheidend für die Pumpfunktion des Endothels und somit wesentlich für den späteren Transplantationserfolg. Des Weiteren erfolgt die Beurteilung der Endothel vitalität und -morphologie. Hierbei wird die Endothelzellschicht auf Nekrosen - deren Größe, Lokalisation und Dichte vitaler Endothelzellen - sowie auf die typische Hexagonalität der Zellstruktur untersucht. Zu Normabweichungen zählt ein ausgeprägter Polymegatismus (unterschiedliche Zellgröße), Pleomorphismus (Aufhebung der hexagonalen Struktur) sowie Vakuolisierung der Endothelzellen. Geringe morphologische Veränderungen sind im Rahmen der Organkultivierung als normal zu werten und unbedenklich für die Transplantation.

Die Endothelzellqualität wird multifaktoriell beeinflusst und ist einerseits durch das Lebensalter, den postmortalen Entnahmezeitpunkt, Entnahmemaßnahmen sowie durch die anschließende Gewebekonservierung beeinflusst (7). Die Hornhaut quillt während der Kultivierung in der Nährlösung auf. Dies schadet der Hornhaut zwar nicht, aber sie kann in diesem Zustand nicht für die Operation zugeschnitten werden, weshalb sie 12 Stunden vor dem Eingriff in eine entquellende Nährlösung gelegt wird. Danach erfolgt eine letzte kritische lichtmikroskopische Endothelevaluierung. Nur wenn hier die erforderliche Endothelqualität erreicht ist, wird die Hornhaut für die Transplantation freigegeben. Für die Durchführung einer perforierenden Keratoplastik ist zusätzlich vorab eine Spaltlampenuntersuchung notwendig, in der die gesamten Hornhautschichten auf Narben und Trübungen überprüft werden. Mangelhafte Transplantatzustände, vor allem eine minderwertige Endothelqualität sind darunter häufigster Verwerfungsgrund. Die bundesweite Gesamtverwerfungsquote von Spenderhornhäuten liegt im Rückblick der vergangenen 10 Jahre zwischen 32 bis 38 % jährlich (5, 81, 82).

2.3 Hornhautbanken

Aktuell gibt es in Deutschland 27 Hornhautbanken (HHB), die sich zu einer Arbeitsgemeinschaft zusammengeschlossen haben und gemeinsam Richtlinien zur Gewinnung einer Hornhautspende und zum Führen einer Augenhornhautbank festgelegt haben.

Hornhautbanken haben das Ziel Spenderhornhäute optimaler Qualität zu gewinnen und diese unter Erfüllung aller Kriterien zur Transplantation bereitzustellen. Dabei richten sie sich nach den Richtlinien der Bundesärztekammer und der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, dem Transplantationsgesetz (TPG), der TPG-Gewebeverordnung (TPG-GewV), dem Arzneimittelgesetz (AMG), der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) sowie den EU-Richtlinien. Hornhautbanken unterliegen im Grunde denselben Verpflichtungen und Rahmenbedingungen wie Transplantationszentren parenchymatöser Organe. Jede dieser Institutionen ist verpflichtet, nach den Vorgaben eines dokumentierten Qualitätsmanagementsystems zu handeln und diese auf den neusten Stand zu halten (83). Die Kosten für die Entnahme, Prozessierung und Kultivierung in der Hornhautbank belaufen sich in Deutschland auf etwa 2000 Euro pro Transplantat (84).

Die Hornhautbank erfüllt im Ablauf der Hornhautspende wesentliche Aufgaben:

- Spenderakquise anhand der medizinischen Eignung und unter Berücksichtigung ophthalmologische Vorerkrankungen

- Aufklärung über Hornhauttransplantation, Einwilligungsgespräche und gesetzliche Grundlagen: die Mitarbeiter der Hornhautbank müssen die Zustimmung des Spenders oder der nächsten Angehörigen einholen und dessen Entscheidung dokumentieren. An dieser Stelle ist auch wichtig nach der Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung im Fall einer nicht transplantierbaren Hornhaut zu fragen
- Entnahme, Präparation und Kultivierung der Hornhäute.
- Freigabe des Transplantats nach Überprüfung und Einhalten der Qualitätskriterien
- Verteilung an die zu transplantierenden Patienten nach bestimmten Allokationsregeln

2.3.1 Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz

Seit den 1970er Jahren wird an der Mainzer Universitäts-Augenklinik die Hornhauttransplantation durchgeführt. Die Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz besteht in jetziger Form seit 2007 und versorgt die Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz sowie andere kooperierende Kliniken innerhalb Deutschlands mit Gewebetransplantaten. Durch Kooperationen mit externen Kliniken in Rheinland-Pfalz und Hessen konnte über die vergangenen Jahre ein Anstieg der Entnahmezahlen verzeichnet werden. Im Jahr 2019 wurden 734 Hornhäute entnommen, von denen 487 Hornhäute (etwa 66%) transplantiert werden konnten, davon 280 intern (85). Die Hornhautbank Mainz ist Mitglied in der Sektion der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft für Gewebetransplantation und Biotechnologie und der European Eye Bank Association (EEBA). Auf dem Gebiet der Spende und der Transplantation von HLA-typisierten Spenderhornhäuten besteht eine Zusammenarbeit mit Bio Implant Services (BIS) in den Niederlanden, die über ein internationales Datenverzeichnis an HLA-typisierten Transplantaten verfügt (86).

2.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress spielt bei der Pathogenese von Erkrankungen des kornealen Endothels, wie die Fuchs- Endotheldystrophie, der bullösen Keratopathie und Seneszenz (87) eine große Rolle. Er ist ein Attribut des aeroben Lebens und entsteht durch ein Ungleichgewicht an reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species [ROS]) und der antioxidativen Pufferkapazität der Zelle (88-90). ROS sind definitionsgemäß reaktionsfreudige Moleküle, die durch eine Elektronen-Reduktion aus Sauerstoff entstehen. Sie kommen in aeroben Organismen stetig vor und haben wichtige zellphysiologische Funktionen, wie die Immunabwehr, Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose(91). Bei hoher Konzentration sowie Akkumulation sind sie jedoch schädlich und an unterschiedlichen Krankheitsgeschehen beteiligt (92, 93). ROS sind sehr reaktionsfreudig und können verschiedene Biomoleküle wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide oxidieren, was zu

Schädigung von Enzymen, Signalmolekülen und Rezeptoren führt und eine Apoptoseinduktion zur Folge haben kann (94). Zu den ROS gehören das Superoxid-Anion (O_2^-), das Hydroxyl-Radikal (OH), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und der Singulett Sauerstoff (1O_2). Neben ROS können auch reaktive Stickstoffspezies (engl. reactive nitrogen species [RNS]) nitro-oxidativen Stress verursachen, dazu zählen u.a. Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) und Peroxinitrit ($ONOO^-$) (92). Mehrere Mechanismen führen zur ROS-Bildung im Organismus, sie entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung (90, 95, 96) und in enzymatischen Stoffwechselreaktionen wie der Oxygenierung oder Dehydrogenierung. Auch werden bei Entzündungsprozessen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen von Makrophagen und weiteren Entzündungszellen zur Abwehr von Mikroorganismen abgegeben. Zudem hat die Einwirkung einer Vielzahl exogener Noxen und Umwelteinflüsse (Lösungsmittel, Konservierungsstoffe, toxische Schwermetalle, Rauchen und Alkohol, UV- und ionisierende Strahlung sowie starke mechanische Beanspruchung) die Bildung von ROS zur Folge (97). Besonders UV-Strahlung sowie der blaue energiereiche Anteil des sichtbaren Spektrums begünstigt die Entstehung von Wasserstoffperoxid und reaktiven Sauerstoffmolekülen in okulären Geweben. Wasserstoffperoxid ist in physiologischen Konzentrationen ein für den Metabolismus wichtiges Signalmolekül. In hohen Konzentrationen kann es jedoch mit anderen Zellbestandteilen interagieren und in einer sogenannten Fenton-Reaktion Eisen Hydroxyl-Radikale, die aggressivste Form von Sauerstoff, erzeugen, was zelluläre Schäden verursachen kann (98). Der Prozessablauf der Hornhautspende, von der Entnahme bis zur Transplantation, kann für die Hornhaut als Stressfaktor angesehen werden und zur übermäßigen Produktion von interzellulären ROS (iROS) beitragen. Die vermehrt gebildeten ROS, die durch antioxidative zelluläre Schutzmechanismen nicht beseitigt werden können, leiten die Lipidperoxidation und damit den Zelluntergang ein. Eine oxidative Degradation von Lipiden durch freie Radikale verursacht Zellmembranschädigungen, die folglich zu einer Permeabilisierung der Zellmembran führen und die Apoptose induzieren (99-101). Auch die Produkte der Lipidperoxidation selbst können den programmierten Zelltod (102) aktivieren. Apoptose ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des kornealen Endothelzellverlusts beispielsweise bei der Fuchs'schen Endotheldystrophie, der *Cornea guttata* und auch bei der Hornhauttransplantatabstoßung (103). Die Mechanismen des kornealen Endothelzellverlustes wurden in den vergangenen Jahren zahlreich untersucht und dabei als wesentliche Faktoren die Lipidperoxidation als auch die Apoptose identifiziert (11).

2.4.1 Exkurs zum Thema Endothelzellverluste durch oxidativen Stress

Eine abnehmende Endothelzellichte ist häufig Ursache einer signifikanten Dysfunktion des Hornhautendothels. Sie gilt auch als Hauptursache für ein spätes Transplantatversagen nach zuvor erfolgreicher Transplantation. Die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion wird

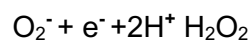
durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Eine große Rolle bei der Pathogenese spielen ROS sowie oxidativer Stress.

Die Endothelzellzahl sowohl prä- als auch postoperativ ist entscheidend für die Transplantation sowie deren späteren Erfolg. In einer Reihe von Studien von Bourne W.M. und Kollegen zwischen 1991 und 1997 werden die Auswirkungen von ophthalmochirurgischen Eingriffen, wie einer Katarakt-Operation oder einer Hornhauttransplantation, auf korneale Endothelzellen beschrieben. In den Arbeiten wurde aufgezeigt, dass in einigen Fällen durch das chirurgische Trauma 1 bis 5 Tage postoperativ eine variable Abnahme der Endothelzelldichte (104, 105) und drei Jahre nach Transplantation eine zunehmende Reduktion von 53 % (106) zu verzeichnen war. In einer weiteren Studie des Ophthalmologen W.M. Bourne und Kollegen untersuchten sie über zehn Jahre (von 1976 bis 1986) 500 Hornhäute nach PKP, bei denen keine Abstoßungsepisoden oder Re-Operationen auftraten. Sie beschreiben durchschnittliche Endothelzellverluste von 7,8 % pro Jahr in den ersten fünf und 4,2 % pro Jahr in den darauffolgenden fünf Jahren (107) nach Keratoplastik. Im Vergleich beträgt der normale altersbedingte korneale Endothelzellverlust ca. 0,6 % pro Jahr. Die Studiengruppe um J. K. Nishimura führte eine prospektive Fallstudie zu spätem Endothelversagen (*late endothelial failure* [LEF]) durch und kam hingegen zu dem Ergebnis, dass Hornhauttransplantate mit LEF in einer anfänglichen niedrigen Endothelzelldichte als an einer erhöhten Rate chronischen postoperativem Zellverlustes begründet sind. Dem zufolge sollten verbesserte Techniken zur Erhaltung der Hornhaut die LEF-Rate verringern (59). Auch Methode und Dauer der Hornhautkultivierung haben Auswirkungen auf das korneale Endothel. Hypotherme Kurzzeitkonservierung bei + 4 °C zeigen eine signifikante Korrelation zwischen Lagerzeit und Abnahme der Zelldichte, dabei verzeichnen Hornhäute mit einer längeren Konservierungszeit höhere Zellverluste (108, 109). Endothelzellverluste in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer wurden 1983 von Pels E. et al. auch bei Hornhäuten in Organkultur bei 34 °C festgestellt (110). Ein Großteil der endothelialen Zellverluste kann auf Apoptose, unabhängig der jeweiligen Konservierungsmethode, zurückgeführt werden (6, 111). Beide Lagerungssysteme stellen eine belastende Umgebung für das Spendergewebe dar. In einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit zu oxidativem Stress in der Kultivierungsphase von Hornhauttransplantaten konnte ein signifikanter Anstieg von Malondialdehyd (MDA), ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation sowie ein häufig verwendeter Marker für oxidativen Stress, in Organkulturmedium nachgewiesen werden. Sie fanden heraus, dass in den Kultivierungsfläschchen der humanen Spenderhornhäute ein oxidativer Gradient mit signifikanter Wirkung auf die zelluläre antioxidative Abwehr und die Lipidbestandteile auftritt (112). Spendergewebe, das am Boden oder in niedrigeren Ebenen solcher Fläschchen gelagert wird, ist einem erheblichen Ausmaß oxidativem Stress ausgesetzt (112). Schlussfolgern könnte man daraus, dass verbesserte Techniken zur Lagerung der Hornhaut

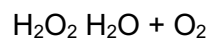
die Endothelzelldichte stabilisiert und die Verluste möglicherweise verringert, was wiederum einen positiven Einfluss auf die Rate des späten Endothelversagens nimmt und die Lebensdauer des Transplantats verlängert. Eine Strategie dazu könnte die Anwendung von Antioxidantien in der Kultivierungsphase sein, um oxidativen Stress zu puffern und die Apoptose zu vermindern. In dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendeten wir Resveratrol.

2.5 Antioxidative Abwehrmechanismen der Hornhaut

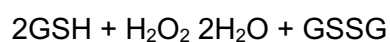
Nahezu jede Körperzelle ist freien Radikalen ausgesetzt und verfügt daher über umfangreiche Abwehr- und Reparaturmechanismen, die den oxidativen Stress mindern sollen. Der antioxidative Mechanismus beruht auf verschiedenen Zellfunktionen. Unterschieden wird dabei zwischen enzymatischer Abwehr, Chelatierung von Metallionen und direkt reduzierender Antioxidantien. Die enzymatische antioxidative Abwehr bilden die Superoxiddismutasen (SOD) (113), die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Die Hornhaut verfügt über drei verschiedene SOD, deren Aufgabe in der Dismutation von Superoxid-Anionen besteht. Sie katalysiert das Superoxid-Anion unter Aufnahme eines weiteren Elektrons entsprechend des folgenden Reaktionsschemas zu Wasserstoffperoxid.



Wasserstoffperoxid muss unter Einsatz von Eisen-abhängigen Katalasen reduziert werden (114).



Die Glutathion-Peroxidase ist das sowohl wichtigste Enzym zur Reduktion von H_2O_2 und Lipidperoxiden, deren Mechanismus weiter unten erläutert wird. Neben den enzymatischen Antioxidantien gibt es auch eine Reihe von antioxidativ aktiven Stoffen, die freie Radikale direkt reduzieren, wie etwa Vitamine, Glutathion, Albumin und metallbindende Proteine. Glutathion (GSH) besteht aus den drei Aminosäuren: Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Es ist in fast allen Körperzellen in hoher Konzentration vorhanden und jede Zelle besitzt auch die Fähigkeit GSH zu synthetisieren. Dabei ist die hauptsächliche Biosynthese in der Leber essenziell. In einem Versuchsmodell an Mäusen hat man eine gestörte GSH-Produktion in der Leber untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Mäuse innerhalb eines Monats nach Geburt verstarben (115). GSH schützt zelluläre Proteine und Membranlipide vor freien Radikalen, in dem es durch eine reversible Oxidation von seiner monomeren Form als GSH in das Dimer Glutathiondisulfid (GSSG) übergeht. So werden organische Peroxide, H_2O_2 sowie freie Radikale durch die Glutathionperoxidase, dessen CO-Faktor GSH ist, reduziert. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O . Die Reaktion lautet wie folgt:



Das bei der Reaktion entstandene Glutathiondisulfid (GSSG) wird durch das Enzym Glutathiondisulfid-Reduktase mittels NADPH/H^+ als Reduktionsmittel wieder zu zwei Molekülen Glutathion regeneriert (37). Reduziertes Glutathion (GSH) besitzt eine freie

Thiolgruppe und kann Elektronen auf ROS übertragen und sie so unschädlich machen. Das Verhältnis von reduzierten und oxidierten Glutathion ist für die Funktionsfähigkeit des Hornhautendothels von großer Bedeutung, da es die endothelialen Wasserpumpen vor dem schädigenden Einfluss freier Radikale schützt (116). Eine experimentelle Oxidation von Glutathion durch Diamide führte zu einem Zusammenbruch der Barrierenfunktion des Endothels (117). In der gesunden Hornhaut sowie im Tränenfilm sind Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Katalase, Ascorbat (Vitamin C), Glutathion, Glutathionperoxidase und proteinbasierte Antioxidantien vorhanden. Ascorbat wirkt als Reduktionsmittel und reagiert schnell mit ROS, wodurch die Hornhaut vor oxidativem Stress geschützt ist, zusätzlich wirkt es als Filter von UV-Licht. UV-Strahlung induziert eine homolytische Spaltung von Wasserstoffperoxid. Das dabei entstehende hochreaktive Hydroxyl-Radikal kann Schäden an Makromolekülen wie DNA und Lipiden verursachen. In Studien wurde gezeigt, dass Ascorbat in tagaktiven Säugetieren bis zu achtmal stärker im Hornhautepithel und -stroma konzentriert ist. In den vergangenen Jahren sind Antioxidantien vor allem die Vitamine A, B, D und E weiter in den Fokus der Forschung gerückt, mit dem Ziel die Pathogenese von Krankheiten infolge oxidativen Stresses zu mindern. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde festgestellt, dass Antioxidantien, die in Obst und Gemüse enthalten sind, wie Vitamin C, Vitamin E und Carotinoide, das AMD-Risiko wirksam reduzieren (118), was darauf hindeutet, dass eine ausreichende nutritive Aufnahme von Antioxidantien die Entwicklung von Netzhauterkrankungen verzögern kann. In einer Studie von Serbecic und Beutelspacher wird anhand eines neuen *In-vitro*-Modells der Einfluss von Vitamin A auf die Apoptoserate und Lipidperoxidation an kornealen Endothelzellen untersucht. Sie konnten nachweisen, dass die Supplementierung von Vitamin A zu kornealen Endothelzellen die Entstehung von Schäden durch freie Radikale reduziert (119). Darüber hinaus gibt es mehrere *In-Vitro*- und Tierstudien die auf eine Beziehung zwischen Radikalfängern und einem reduzierten Endothelzellverlust hindeuten (120). Die Rolle von RSV, als wirksames Antioxidans, in kornealen Erkrankungen bzw. in Bezug auf die Pathogenese des Endothelzellverlustes wurde bisher nicht untersucht und ist daher von besonderem Interesse.

2.6 Resveratrol

2.6.1 Effekte von Resveratrol

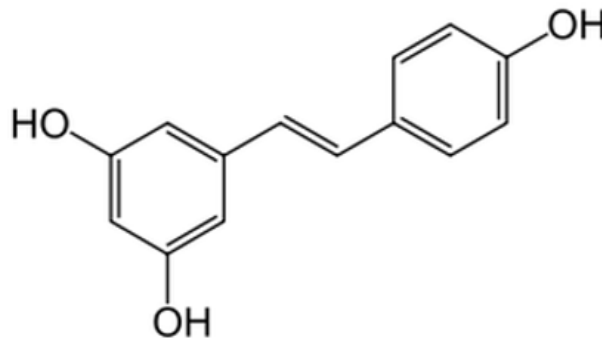


Abbildung 7: Strukturformel von Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben)

RSV (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein pflanzliches Polyphenol und in vielen verschiedenen Pflanzenspezies, einschließlich Erdnüssen, Beeren und Trauben enthalten. RSV wurde erstmals im Jahr 1939 von Michio Takaoka, einem japanischen Wissenschaftler entdeckt und benannt, in dem er die Substanz aus der Heilpflanze *Veratrum grandiflorum* isolierte (121). In der Natur existieren beide Isomere des RSV, wobei das *trans*-Isomer weitaus häufiger vorkommt, die stabilere Form der beiden Isomeren ist und auch dem Großteil seiner biologischen Aktivität zugeschrieben werden (122). Bis heute wurden seit der Entdeckung von Resveratrol umfangreiche Studien in diversen medizinischen Forschungsbereichen durchgeführt. In vitro-Studien haben Hinweise auf positive Effekte gegen Krebszellen erbracht. Andere vielzählige Studien haben antioxidative, antiangiogene und antientzündliche Effekte von RSV bei Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, der Alzheimer-Krankheit sowie bei Autoimmunkrankheiten zeigen können. Die wohl populärste Veröffentlichung in der Geschichte von RSV war das sogenannte „Französische Paradoxon“. Dieser Term besteht seit 1992 und beruht auf den epidemiologischen Auswertungen der Inzidenz für Koronare Herzkrankheit in der französischen Bevölkerung, die vergleichsweise niedrig war. Renaud et al. schrieb das geringere Auftreten von Herzinfarkten bei Franzosen dem regelmäßigen Genuss von Rotwein zu (123). Die Konzentration von RSV in Rotwein liegt zwischen 0 und 14,3 mg/l *trans*-Resveratrol (124) und ist im Vergleich zu anderen Resveratrolquellen relativ hoch. Die kardioprotektiven Effekte von RSV beruhen zu einem auf der Hemmung der Thrombozytenaggregation (125), der Inhibierung der Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (126) sowie der Hemmung der Endothelin-1- Synthese und reduzierten so oxidativen Stress sowohl in Endothelzellen als auch in der glatten Gefäßmuskulatur. Durch pathologische Reize induzierte Proliferation glatter Muskelzellen, Gefäßumbau und arterielle Steifheit werden durch RSV gemindert (127). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass RSV einen durch die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* induzierten oxidativen Stress in Atemwegsepithelien

vermindert. Es wurden Bronchialepithelzellen mit H_2O_2 kompetenten *Streptococcus pneumoniae* stimuliert und die Veränderungen des Glutathionstoffwechsels unter RSV untersucht, mit dem Ergebnis, dass unter Zugabe von RSV der Abfall des Quotient GSH/GSSG nicht mehr nachweisbar war (128). In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von RSV in Granulosazellen im Ovar untersucht, die durch einen Anstieg der Lipidperoxidasenaktivität und ROS in Apoptose gehen. Die Behandlung mit RSV wirkte präventiv und verhinderte durch Senkung des oxidativen Stresses Zellschäden. Zudem konnte eine reduzierte Apoptose-Rate bei gleichzeitiger Induktion der Zellproliferation beobachtet werden. RSV fungiert als sehr wirksamer Radikalfänger bei verschiedenen Oxidationsmitteln, einschließlich Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen. Die antioxidativen Eigenschaften von RSV sind begründet in seiner chemischen Struktur. Die Phenolringe mit den drei Hydroxygruppen (OH-Gruppe) in Position 3, 4, 5 und der konfigurierten Doppelbindung (siehe Abb. 3). Die 4'-OH-Gruppe ist für die Radikalfängeraktivität von RSV essenziell, jedoch wirken die anderen OH-Gruppen synergistisch.

2.6.2 RSV in ophthalmologischen Studien

Der folgende Abschnitt bietet einen kurze Literaturübersicht über die antioxidativen, antiapoptotischen Eigenschaften von RSV und die molekularen Mechanismen innerhalb der Augenstrukturen. Oxidativer Stress ist an der Pathogenese mehrerer Augenkrankheiten beteiligt, einschließlich des primären Offenwinkelglaukoms (POWG), einer weltweit häufigen Erblindungsursache (129). Erhöhter Augeninnendruck stellt das größte Risiko für die Entstehung eines POWG dar. Dieser entsteht durch einen Anstieg des Abflusswiderstandes im Trabekelmaschenwerk (TM) bzw. nachgeschalteten Strukturen (130, 131). Eine Studie von Luna et al. (2009) untersuchte das therapeutische antioxidative Potenzial von RSV bei der Regulierung der Expression von Glaukom-Markern in TM-Zellen infolge chronisch erhöhtem oxidativen Stress (132). Die Untersuchungen zeigten, dass eine Fehlfunktion des TM beim POWG mit einer Reihe erhöhter Entzündungsmarker und ROS verbunden ist. In einer früheren Studie aus dem Jahr 2007 von Zhoe et al wurden in einem Modell TM-Zellen mit H_2O_2 inkubiert und wodurch sie erhöhte ROS und Glaukom-Marker induzierten (133). Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zum einen die Entwicklung eines Glaukoms begünstigt (134) und darüber hinaus die Induktion von Apoptose zum Verlust der Zellularität und Zellzahl im TM beiträgt (135). In einer Studie von Luna et al. wurde die orale Gabe von RSV auf die Expression von Entzündungsmediatoren und ROS untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Gabe von RSV wirksam die Produktion von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (iROS) sowie Entzündungs- und Glaukommarkern (IL1 α , IL6, IL8 und ELAM-1) minderte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Resveratrol einen positiven Effekt bei der beobachteten TM-Gewebeanomalien in POWG hat.

Ein weiteres häufiges ophthalmologisches Krankheitsbild ist die Katarakt, umgangssprachlich auch als grauer Star bezeichnet. Dabei kommt es allmählich zu Linsentrübungen und dem Nachlassen des Sehvermögens. Die Entstehung der altersabhängigen Katarakt korreliert mit einem chronisch erhöhten oxidativem Stresslevel in den Faserzellen der Linse. Die altersbedingte Katarakt ist in vielen Ländern immer noch Hauptursache für Blindheit und wird zumeist in den Industrieländern durch einen operativen Eingriff und den Einsatz einer künstlichen Linse behoben. Obwohl der genaue Mechanismus der Kataraktbildung nicht geklärt ist, wird angenommen, dass die Oxidation von Proteinen innerhalb der Linse eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt. In einem In-vivo-Tier-Versuchsmodell wurde Ratten Natriumselenit injiziert, was zu einer raschen Kataraktbildung führte (136) und für die Untersuchung einer medikamentösen Therapie bei altersbedingter Katarakt herangezogen wurde. Doganay et al. untersuchten die Wirkung von RSV bei der Selenit-induzierten Kataraktbildung (136). Sie stellten fest, dass die Gabe von RSV zu einem Anstieg des reduzierten GSH-Spiegels in Rattenlinsen führte (136) und dieser vor Schäden durch Oxidationsmittel schützt (137). Zudem wurde gezeigt, dass der zelluläre GSH-Spiegel eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Linsenfunktion spielt und bei der altersbedingten Kataraktbildung, sowohl in menschlichen und Selenit-induzierten Katarakten bei Ratten reduziert ist (132, 136). Darüber hinaus war die Konzentration von Malondialdehyd (MDA), einem Marker für die Lipidperoxidation, in mit RSV behandelten Rattenlinsen signifikant niedriger (136). Die Ergebnisse bestätigen die Beteiligung von oxidativem Stress an der Ätiologie des Katarakt und schreiben RSV eine präventive Rolle zu (132, 136). In einer anderen Studie werden positive Effekte bei der Anwendung von RSV in der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration beobachtet (138). Als pathologischer Mechanismus, der zur Entstehung einer altersabhängigen Makuladegeneration führt, wird eine Schädigung des retinalen Pigmentepithels (RPE) aufgrund erhöhter ROS angenommen. Die Untersuchung von Janus et al sollte die protektive Wirkung von RSV gegen H₂O₂-induzierten oxidativen Stress in kultivierten menschlichen RPE-Zellen bewerten. In dieser Studie wurden die RPE-Zellen mit verschiedenen RSV-Konzentrationen (25, 50 und 100 µM) für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit 500 µM H₂O₂ für 1 Stunde versetzt. Resveratrol in Kulturmedien hatte bei einer Konzentration von 25 - 100 µM keine zytotoxische Wirkung, zeigte jedoch eine Schutzwirkung gegen Wasserstoffperoxid-induzierte Zytotoxizität. Die Vorbehandlung mit Resveratrol induzierte einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der Superoxiddismutase-, Glutathionperoxidase- und Katalase-Aktivität. Darüber hinaus erhöhte Resveratrol den Gehalt an reduziertem Glutathion sowohl unter basalen als auch unter oxidativen Stressbedingungen signifikant. Die Hemmung der intrazellulären ROS-Erzeugung stützt die Hypothese, dass Resveratrol zur antioxidativen Abwehr beiträgt, indem es die ROS in RPE-Zellen direkt abfängt. In experimentellen Studien zu oxidativem Stress und diabetischer

Retinopathie konnten antioxidative und antiglykämische Effekte von RSV dargestellt werden. Die Retinopathie, eine mikrovaskuläre Komplikation von Diabetes mellitus, ist die Hauptursache für erworbene Blindheit bei betroffenen Patienten (139, 140). Oxidativer Stress wurde als ein kritischer Beitrag zur Pathogenese der diabetischen Retinopathie bestätigt (141, 142). Die durch Hyperglykämie induzierte Überproduktion von ROS und Unterdrückung des antioxidativen Abwehrsystems durch eine Hyperglykämie-vermittelte epigenetische Modifikation (143), kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Abbau und der Produktion von ROS und infolge dessen zu Mitochondrienschäden, zellulärer Apoptose, Lipidperoxidation sowie strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Netzhaut. (114, 144).

Nach umfangreicher Literaturrecherche zu RSV mit vielversprechenden Studienergebnissen zielt diese experimentelle Arbeit auf die Verwendung von RSV als Adjuvans in der Kultivierung von Spenderhornhäuten ab. In der vorliegenden Arbeit haben wir die Hypothese getestet, dass RSV den H₂O₂-induzierten Zellverlust im Hornhautendothel mindert. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine experimentelle Arbeit, in der wiederholte Messungen an Spenderhornhäuten unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Für die wissenschaftliche Studie wurden insgesamt 16 Spenderhornhäute, die den Qualitätsstandard zur Hornhauttransplantation nicht entsprachen und zur wissenschaftlichen Verwendung freigegeben waren, eingeschlossen. Wenn die aufgrund mangelhafter Qualität „verworfenen Hornhaut“ dennoch eine gute Endothelzellzahl, mindestens 1500 Zellen/mm² und einen nekrotischen Anteil von unter 5 % hatte, wurde die Hornhaut in die wissenschaftliche Studie eingeschlossen. Die erste Beurteilung der Endothelzellqualität erfolgte in Kulturmedium I.

Retrospektiv lässt sich sagen, dass vor allem Hornhäute, die aufgrund eines positiven Screeninglabors verworfen wurden, die o.g. Qualitätskriterien erfüllten und in dieser Studie Verwendung fanden. Die Fallzahl wurde auf n=7 pro Gruppe festgelegt. Zudem wurde aufgrund beobachteter Unterschiede in der Hornhautqualität innerhalb eines Hornhautpaares, d.h. rechte und linke Hornhaut des gleichen Spenders, dazu übergegangen die einzelne Hornhaut in 2 bis 4 annähernd gleichgroße Hornhautanteile zu präparieren und diese unterschiedlichen Gruppen zuzuordnen. In dieser Studie wurden 3 verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, die jeweils aus einer Expositions- und einer Kontrollgruppe bestand.

Da H₂O₂ eine zentrale intrazelluläre ROS-Verbindung darstellt, die im Organismus bei enzymatischen Stoffwechselprozessen entsteht und experimentell gut anwendbar ist, haben wir diese zur Induktion von oxidativem Stress in Spenderhornhäuten festgelegt. Geeignete Konzentrationen wurden basierend auf bereits veröffentlichten Daten ausgewählt, dabei wurde angenommen, dass die direkte Wirkung auf Zellen durch Oxidationsmittel wie H₂O₂ nicht nur ausschließlich eine Nekrose verursacht, sondern niedrige H₂O₂-Konzentrationen vor allem eine Apoptose auslösen (145). Zu Studienbeginn stand zunächst eine Versuchsreihe an Spenderhornhäuten zur Ermittlung einer geeigneten H₂O₂-Konzentration an. Es sollte mittels H₂O₂ an kornealen Endothelzellen oxidativer Stress verursacht werden, der im Verlauf zu Apoptose und innerhalb einer Woche zu einer Reduzierung der initialen Endothelzellzahl um etwa 50 % führt. Anschließend sollte der antioxidative Effekt von RSV auf gestresste Hornhautendothelzellen untersucht werden. In einer Versuchsreihe wurde die Zelltoxizität von RSV und DMSO untersucht. Während des experimentellen Verlaufs einer Versuchsreihe wurde die Spenderhornhaut in Kulturmedium II gelagert. Ein Wechsel des Kulturmediums oder eine erneute Zugabe von bovinem Serum fand nicht statt. Die experimentellen Versuche und

die Erhebung der Daten fanden in der Zeit von Juni 2018 bis Januar 2021 in der Hornhautbank Mainz statt.

3.2 Materialien

Nachfolgend ist eine tabellarische Auflistung der in den experimentellen Versuchsreihen verwendeten Materialien.

Tabelle 1: Verwendete Materialien in der Hornhautbank

Name	Hersteller
Peha-soft Handschuhe, Nitril powderfree	Paul Hartmann AG, Deutschland
Sterile OP-Handschuhe Vasco®	B. Braun Melsungen AG, DE
OP-Hauben BARRIER®	Mölnlycke Health Care GmbH, DE
Steriler Op-Mantel Eclipse	Medline
Sterile Werkbank	Heraeus, DE
Anatomische Pinzette (1mm)	Geuder AG, Germany
Kleine Chirurgische Schere, spitz	Geuder AG, Germany
Wasserbad 34 °C	Memmert GmbH, Germany
Brutschrank 34,4 °C	Heraeus Thermo, Deutschland
BSS-Lösung hypoton pH ca 7,5	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
BSS-Lösung pH ca.7,2	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fötales Bovines Serum	Biochrom GmbH, Germany
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach, DE
Gibco DPBS	ThermoFisher Scientific, USA
H ₂ O ₂ -Lösung	Labor Augenklinik Mainz
ImageJ 1.53a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Infusionsfläschchen mit Stopfen	Universitätsmedizin Mainz
Kulturmedium I (80 ml Behälter)	Biochrom GmbH, Germany
Kulturmedium II (80 ml Behälter)	Biochrom GmbH, Germany
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-5	Nikon
SL-Pette XE Pipette	Nichiryo

Pipette	Eppendorf
Resveratrol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
transparente 12- Wellplatte	Falcon™

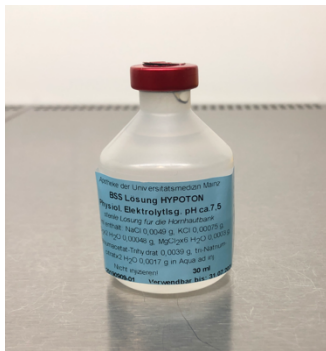
3.3 Organkultur

Das Kulturmedium spielt eine wesentliche Rolle bei der Gewährleistung von Qualität und Sicherheit des Spendergewebes. In den Versuchsreihen wurde Kulturmedium der Firma BIOCHROM AG verwendet; hierbei wird zwischen Kulturmedium I (M1) und Kulturmedium II (M2) unterschieden. Das Nährmedium für die Zellkultur enthält Aminosäuren, Vitamine und anorganische Salze für die Aufrechterhaltung der kornealen Zellfunktionen. Zusätzlich ist ein Farbindikator für die Kontrolle des pH-Wertes enthalten. Da das Spendergewebe nach Desinfektion des Auges mit geeigneten Desinfektionsmitteln nicht steril ist, sind dem Kulturmedium auch Antibiotika (Penicillin-G-Natrium und Streptomycinsulfat) und Antimykotika (Amphotericin B) gegen die zu erwartenden Bakterien- und Pilzspezies zugesetzt. In dem Kulturmedium M2 sind zusätzlich 60 g (6 %) Dextran enthalten, weshalb es hauptsächlich als temporäres Transport- und Entquellungsmedium Verwendung findet. Die Kulturmedien werden bei - 20 °C gelagert und bei Bedarf im Wasserbad bei 37 °C langsam erwärmt.

Zusätzlich wird das Kulturmedium mit fötalem Kälberserum versetzt. Standardmäßig wird in der HHB Mainz 1,6 ml fötales Kälberserum zu 80 ml Kulturmedium M1/M2 zugegeben, sodass insgesamt ein 2%iger Serumzusatz enthalten ist. Durch diese Zusammensetzung werden der Hornhaut wachstumsfördernde Faktoren und zellunterstützende Proteine bereitgestellt (146). Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Medien ist im Anhang zu finden.

3.4 Balanced Salt Solution

BSS ist eine sterile, isotone Elektrolytlösung mit einem neutralen pH-Wert und wird in der Ophthalmologie aufgrund seiner nicht-toxischen Wirkung auf okuläres Gewebe häufig als intraokuläre Spüllösung eingesetzt. Die in der Hornhautbank Mainz verwendete BSS-Lösung wird in der hauseigenen Apotheke der Universitätsmedizin Mainz hergestellt, sterilfiltriert und auf einen physiologischen pH- Bereich von 7,1 bis 7,6 geprüft. BSS findet in der HHB Mainz zur kurzfristigen Entquellung der Endothelzellen für eine valide Endothelzellevaluierung Verwendung und sollte dafür hypotone Lösungseigenschaften aufweisen. Demzufolge wird in einer hypotonen BSS-Lösung ist der Natriumchlorid-Anteil verringert. Die genaue Zusammensetzung ist nachfolgend beschrieben.

Produktinhaltsstoffe:

NaCl	0,490 %
KCl	0,075 %
CaCl ₂ -Dihydrat	0,048 %
MgCl ₂ -Hexahydrat	0,039 %
NaHCO ₃	0,390 %
Aqua ad iniectionabilia	98,797 %

Abbildung 8: BSS-Lösung aus Herstellung der Universitätsmedizin Mainz

3.5 (D)PBS

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ist eine phosphathaltige Pufferlösung mit einem physiologischen pH-Wert bei 7,3. In Zusammensetzung ist es eine ausgeglichene Salzlösung ohne Zusatz von Calcium, Magnesium und Phenolrot und für die Zellkulturanwendung geeignet. Da PBS für humane Zellen nicht schädlich ist, verwendeten wir PBS in der Versuchsreihe zur Verdünnung von Lösungen.

Zusammensetzung:

- 8,0 g/L Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2 g/L Kaliumchlorid (KCl)
- 1,42 g/L Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
- 0,27 g/L Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

3.6 Mikroskop

Für die Befundung der Endothelzellschicht wurde das Universalmikroskop Nikon Eclipse TE2000-5, welches mit dem optischen Kamerasystem Nikon CFI-60 Objektiv ausgestattet ist, verwendet. Es gewährleistet eine helle, kontrastreiche sowie aberrationsfreie Abbildung und ist vorrangig für Lebendzell-Untersuchungen entwickelt worden. Die Hornhaut wurde mit 250-facher Vergrößerung mikroskopiert. Es erfolgte die computergestützte Mikroskopie, dabei wurde die Endothelzellschicht zunächst manuell fokussiert, die Beurteilung erfolgte jedoch über ein elektronisches Imaging-System, welches zusätzlich für die Aufnahme, Archivierung, Verarbeitung und Auswertung des digitalen Hornhautbildes verwendet wurde.



Abbildung 9: Nikon Eclipse TE2000-5 der Hornhautbank Mainz

3.7 Methoden

Im folgenden Abschnitt ist die Auswahl der verwendeten Spenderhornhäute, der experimentelle Versuchsaufbau sowie die Datenerhebung und -auswertung, wie sie in der Hornhautbank Mainz und am privaten PC erfolgte, beschrieben.

3.7.1 Spenderhornhäute

Die gespendeten Hornhäute werden von der Hornhautbank Mainz prozessiert. Zu Beginn einer jeden Hornhautspende steht die Auswahl geeigneter Spender anhand vordefinierter Spenderkriterien, welche durch die EEBA (*European Eye Bank Association*) festgesetzt wurden, an. Die Spender der Studie wurden durch die Universitätsmedizin Mainz sowie durch die enge Kooperation mit anderen externen Kliniken rekrutiert. Verpflichtend zur Spende war das Vorliegen des Einverständnisses zur Gewebespende, der Ausschluss medizinischer Kontraindikationen und die infektionsserologische Prüfung des Spenders. Die makroskopische Beurteilung der Hornhaut vor Ort sowie die Entnahme einer Sklerokornealscheibe bzw. des Bulbus obliegen dem zuständigen Mitarbeiter der Hornhautbank Mainz. Für die Präparation und Kultivierung der Hornhäute werden entweder ganze Bulbi enukleiert oder nur eine Sklerokornealscheibe sorgfältig ausgestanzt. Die Hornhauttransplantate werden dann in sterilen, luftdicht verschließbaren Schraubbehältern aus Kunststoff mit Transportmedium (M2 mit Zusatz von fetalem Kälberserum) (siehe Kulturmedium, Kapitel 1.8.1) in die HHB Mainz transportiert. Beim Eingang der Hornhautspende wird die Entnahme registriert und der Spender bzw. die Spende fortan im System unter einer Nummer anonymisiert. Dabei wurde im Entnahmebericht Daten zum Spender wie Name, Geschlecht, Geburtsdatum, Sterbezeitpunkt, Todesursache, Zustimmung und Ausschluss von Kontraindikationen erfasst.

Daten zu den verwendeten Materialien wurden mit Etiketten und Chargennummern gesichert. Es wird ein Spenderscreening im Labor anhand prämortale entnommener Blutproben bzw. bei nicht vorhandenen Rückstellproben oder ungenügendem Material, eine maximal 24 Stunden postmortem entnommene Blutprobe im Labor angefordert. Bevor die Hornhaut in Kultur genommen wird, wurde auf makroskopische Unversehrtheit und auf das Einhalten korrekter Transport- und Lagerungsbedingungen geprüft. War alles vollständig und ordnungsgemäß dokumentiert, durfte die Hornhaut weiter prozessiert und in Kultur genommen werden. Für die Inkulturnahme der Hornhäute wird unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. Durch technisch geschulte Mitarbeiter der HHB Mainz wurde der entnommene Bulbus desinfiziert, ein symmetrisches Sklerocornealscheibchen präpariert und in einen Hornhauthalter eingelegt. Die Gewebekulturflasche inklusive Hornhauthalter wird anschließend im Brutschrank aufbewahrt. Die erste Endothelvaluierung erfolgt nach 7 Tagen, worauf im nachfolgenden Kapitel 3.7.2 näher eingegangen wird. Sollte die Endothelzellschicht den Qualitätskriterien mit einer minimalen Zellzahl von 2000 Zellen/mm² und einem nekrotischen Anteil < 5 % nicht entsprechen, wird die Hornhaut verworfen. Bei dieser Untersuchung betrachtet man die gesamte Endothelzellschicht und schätzt den prozentualen Anteil der Nekrosen ab. Verworfene Hornhäute gelangen zurück in den Brutschrank und werden bei entsprechender Einwilligung des Spenders zu Lebzeiten oder nach deren Tod durch die Angehörigen zur wissenschaftlichen Nutzung freigegeben. Wichtig ist, dass im Aufklärungsgespräch über die Hornhautspende ausdrücklich nach dem Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung gefragt wurde. Ist die Spenderhornhaut dafür freigegeben und erfüllt zeitgleich die von mir festgelegten Qualitätskriterien, konnte diese in der Studie eingeschlossen werden. Die Kriterien waren: eine minimale Endothelzellzahl von 1500 Zellen/mm², eine Nekroserate < 5 % und eine vorab bestehende kurze Kultivierungszeit. Insgesamt sollte die Kultivierungszeit 30 Tage nicht überschreiten, da in einigen Studien festgestellt wurde, dass ein erhöhter Endothelzellverlust mit der Lagerungszeit korreliert. Aufgrund einer langen Wartezeit auf geeignete Spenderhornhäute belief sich die Fallzahl auf 7 Hornhäute bzw. Hornhautpaare pro Versuchsreihe.

3.7.2 Mikroskopische Bestimmung der Endothelzelldichte

Die Arbeit an der Hornhautspende erfolgte an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Dies bietet eine partikelarme Arbeitszone und schützt die Hornhaut vor Kontamination durch luftgetragene Organismen, Sporen oder Aerosole. Mit einer sterilen Pinzette wurde die Hornhaut vorsichtig am Sklerarand gefasst, aus ihrem Verankerungssystem gelöst und mit der Krümmung nach oben in eine 12-Loch-Wellplatte mit hypotoner BSS-Lösung gelegt. 3 ml BSS-Lösung werden pro Well pipettiert, damit die Hornhaut vollständig mit Lösung bedeckt ist. Durch die Gabe in eine hypotone BSS-Lösung treten die Endothelzellgrenzen durch Quellen des interzellulären

Raumes hervor und können so am Lichtmikroskop evaluiert werden (71). Die Verweilzeit der Hornhaut in hypotoner BSS-Lösung sollte nach Herstellerangaben drei Minuten nicht überschreiten und muss daher zügig mikroskopiert werden. Andernfalls droht aufgrund der osmotisch wirksamen Lösung eine Schädigung des Endothels. Die Hornhaut wird in der Wellplatte auf den Präparatetisch des Mikroskops gelegt und bei 250-facher Objektvergrößerung untersucht. Dabei wird die Endothelzellschicht aufgesucht, fokussiert und von einem Ausschnitt des Endothels ein digitales Bild erstellt. Dieses wird anschließend mittels spezieller Bildanalyse-Software „Robin Endothel Analyzer“ (REA) ausgewertet und als Bilddatei gespeichert. Zuvor wird ein größendefinierter Analyserahmen in eine repräsentative Stelle des Endothels gelegt, der die Endothelzellen innerhalb des Analyserahmens über eine automatische Zellmembranerkennung erfasst und zählt. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 10. Im nächsten Schritt erfolgt in einem manuellen Erfassungsmodus die fachmännische Beurteilung der automatischen Zellzählung und gegebenenfalls eine Korrektur. Vor allem sehr kleine und nicht vollständig erfasste Endothelzellen werden nicht korrekt bewertet und müssen editiert werden. Jede Zählung wird als Bildformat dokumentiert und archiviert. Die Endothelzellschicht der Hornhaut wird insgesamt an 5 Stellen, zentral und in den 4 peripheren Quadranten, beurteilt.

In der Studie wurde für die Beurteilung der Endothelzellzahl ein weiteres Bildanalyseprogramm (Image J) verwendet. Die Endotheldarstellung und Bilddokumentation erfolgte regelrecht mittels REA-Software, anschließend erfolgte eine rein manuelle Auszählung der Endothelzellen mit Image J (Kapitel 1.9.3).

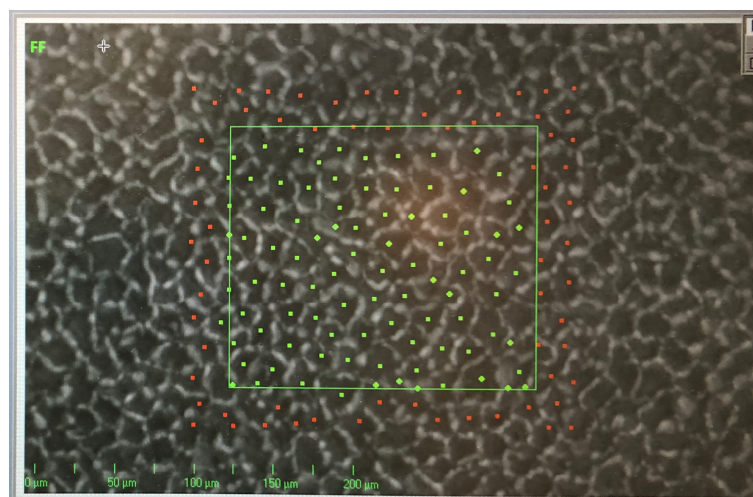


Abbildung 10: Robin Endothel Analyzer. Abgebildet ist die Endothelzellschicht und der Analyserahmen für die Bestimmung der Endothelzelldichte im ausgewählten Bereich. Alle Endothelzellen mit grünem Punkt wurden automatisch erfasst. Bei der manuellen Korrektur können falsche gesetzte Punkte entfernt oder fehlende hinzugefügt werden.

3.7.3 Endothelzellzählung

Zur Endothelzellzählung wurde die Software ImageJ 1.53a verwendet. Image J ist ein amerikanisches Bildbearbeitungsprogramm, welches vielfach für medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse genutzt wird. ImageJ wurde 1997 von Wayne Rasband, einem Mitarbeiter des *National Institute of Health* entwickelt (147).

Unter Zuhilfenahme eines externen Speichermediums wurden die in REA erstellten und gespeicherten Endothelaufnahmen in das Programm ImageJ übertragen. Im Unterschied zum Robin Endothel Analyzer wurde in Image J das im gesamten Bild erfasste Endothel manuell ausgezählt. Mit dem Funktionstool „*multi-point*“ wurde jede einzelne Endothelzelle mit einem Punkt markiert und gezählt. In der Abbildung 11 ist exemplarisch eine markierte Endothelaufnahme dargestellt.

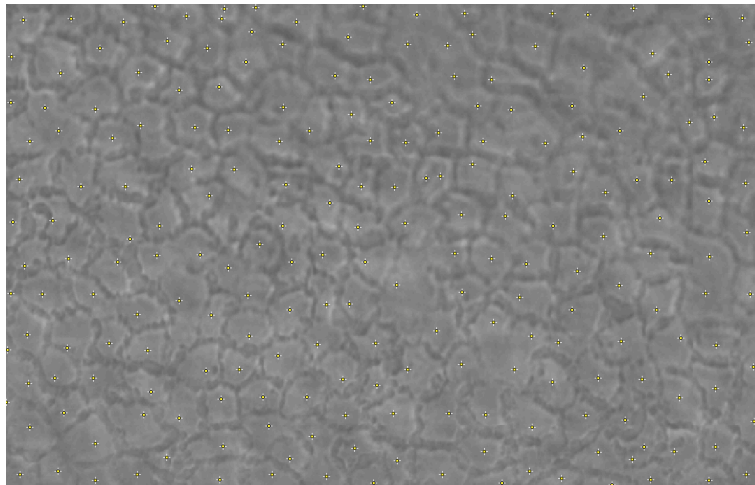


Abbildung 11: Endothelausschnitt in Bildformat. Bearbeitung und Endothelzellzählung mit ImageJ. Manuell wird jede einzelne Endothelzelle mit einem gelben Punkt markiert und somit erfasst.

3.7.4 Behandlung der Spenderhornhäute

Die experimentelle Arbeit mit humanen Spenderhornhäuten erfolgte in insgesamt vier Versuchsreihen, die sich gering in ihrem Versuchsaufbau und den angewendeten Substanzen unterschieden. Abschließend wurde noch eine immunhistochemische Färbung an zuvor kryokonservierten Spenderhornhäuten durchgeführt. Die Auswahl der entsprechenden Hornhaut ist bereits in Kapitel 1.9.1 beschrieben. Die Methodik für das oxidative Stressmodell und die Anwendung von RSV (die Konzentration sowie die Inkubationszeit) wurden anhand zuvor veröffentlichter Studienarbeiten ausgewählt (148, 149). Der Versuchsaufbau ist im Folgenden detailliert beschrieben.

3.7.4.1 1. Versuchsreihe - Induktion von oxidativem Stress und Bestimmung der H₂O₂-Konzentration

In der **1. Versuchsreihe** wurde das Hornhautendothel vermehrtem oxidativen Stress ausgesetzt. Wie in Kapitel 1.13.1 beschrieben, eignete sich dafür besonders H₂O₂. Ziel dieser Versuchsreihe war es durch ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress einen sichtbaren Endothelzellverlust hervorzurufen. Dafür musste das exakte Verhältnis von H₂O₂-Konzentration und Expositionszeit, in der eine Endothelzellreduzierung von durchschnittlich 50 % nach sieben Tagen eintritt, ermittelt werden. Der Versuchsaufbau war als Verdünnungsreihe angelegt und ging insgesamt über neun Tage. Vor Versuchsbeginn war die Herstellung einer H₂O₂-Lösung und die Evaluierung der Spenderhornhaut erforderlich. Für eine verifizierte mikroskopische Erhebung der Endothelzellzahl musste die Spenderhornhaut von M1 in M2 umgesetzt und nach 24 Stunden Entquellungszeit am Mikroskop bewertet werden. Aufgrund einer sehr geringen Anzahl an verfügbaren Hornhäuten, wurden diejenigen mit einer optimalen Endothelzellzahl >2000/mm² gevierteilt und anschließend in M2 kultiviert. Vor der Inkubation mit H₂O₂ wurden die Hornhautviertel erneut evaluiert, um auszuschließen, dass das mechanische Trauma nicht selbst zu einem Endothelschaden führt. Als Kontrollgruppe wurde ein Hornhautviertel ebenfalls unter standardisierten Kultivierungsbedingungen ohne Exposition mit H₂O₂ gelagert.

Zur Herstellung einer 10⁻² molaren H₂O₂-Stammlösung gaben wir 1 ml einer 30 % igen H₂O₂-Lösung in 100 ml PBS. Die Behandlung mit H₂O₂ erfolgte in einem separaten Infusionsfläschchen. Je nach gewünschter H₂O₂-Konzentration wurde das entsprechende Volumen mit einer Pipette aus der Stammlösung entnommen und in das entsprechende Medium gegeben. Zur Verdeutlichung ist beispielhaft die Herstellung einer 400 µM H₂O₂-Konzentration beschrieben:

In ein steriles Infusionsfläschchen wurden 20 ml M2 gegeben. Dazu wurde 800 µl H₂O₂-Stammlösung pipettiert, sodass letztendlich eine H₂O₂-Konzentration von 400 µM entstand. Da die Hornhäute nur für eine Inkubationszeit von maximal einer Stunde in das Infusionsfläschchen gesetzt wurden, verzichteten wir auf die Zugabe von fötalen Kälberserum.

In der **1. Versuchsreihe** wurden die Hornhäute mit einer H₂O₂-Konzentration von 200 µM und 100 µM über 30 Minuten sowie 200 µM über 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie wieder in das ursprüngliche Fläschchen mit M2 gesetzt. Danach erfolgte eine regelmäßige und dokumentierte Endothelevaluierung, insgesamt über einen Zeitraum von 7 Tagen. Im Folgenden ist der zeitliche Ablauf der **1. Versuchsreihe** beschrieben:

Tag 1 Start der Versuchsreihe: *Entnahme der Hornhaut aus Kulturmedium M1, Vierteilung der Hornhaut und Umsetzen des Hornhautsegments in 20 ml serumhaltigem Medium M2.*

- Tag 2 1. Mikroskopische Untersuchung: *Kontrolle der Endothelzellzahl und Beurteilung, der Hornhaut. Bei guter Endothelzellzahl anschließende Inkubation mit H₂O₂ (100 und 200 µM für je 30 und 15 Minuten) in einem separaten Gefäß.*
- Tag 3 2. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 24 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 5 3. Mikroskopische Untersuchung: 2. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 72 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 7 4. Mikroskopische Untersuchung: 3. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 120 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 9 5. Mikroskopische Untersuchung: 4. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 168 Stunden (7. Tag) nach Inkubation mit H₂O₂.*

Nach Auswertung der ersten Versuchsreihe wurde gesehen, dass die bisher getesteten H₂O₂-Konzentrationen nicht ausreichend waren, um innerhalb der zeitlichen Vorgabe eine 50%ige Viabilität der Endothelzellen zu verursachen. Daher wurden in einer **2. Versuchsreihe** die Spenderhornhäute mit höheren H₂O₂-Konzentrationen und einer veränderte Expositionszeiten (200 µM für 60 min, 300 µM für 30 min und 400 µM für 30 min) inkubiert.

- Tag 1 Start der **2. Versuchsreihe**: *Entnahme der Hornhaut aus Kulturmedium M1, Vierteilung der Hornhaut und Umsetzen des Hornhautsegments in Medium M2.*
- Tag 2 1. Mikroskopische Untersuchung nach 24 Stunden im Entquellungsmedium: *Kontrolle der Endothelzellzahl und Beurteilung der Hornhaut. Bei guter Endothelzellzahl anschließende Inkubation mit H₂O₂ (200 µM für 60 Minuten, 300 µM und 400 µM für je 30 Minuten).*
- Tag 3 2. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 24 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 5 3. Mikroskopische Untersuchung: 2. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 72 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 7 4. Mikroskopische Untersuchung: 3. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 120 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂.*
- Tag 9 5. Mikroskopische Untersuchung: 4. *Beurteilung der Hornhaut und Endothelzellzählung 168 Stunden (7. Tag) nach Inkubation mit H₂O₂.*

3.7.4.2 Resveratrol- vs. Kontrollgruppe - 3. Versuchsreihe

Für die Herstellung der RSV-Lösung wurde folgende Formel angewendet:

$$c \text{ [mol/l]} \cdot V \text{ [l]} \cdot M \text{ [g/mol]} = m$$
$$[0,01 \text{ mol/l} \cdot 0,01 \text{ l} \cdot 228,25 \text{ g/mol} = 0,023 \text{ g}]$$

c = Stoffmengenkonzentration [mol/l]

V = Volumen [l]

M = molare Masse [g/mol]

m = Masse [g]

23 mg RSV wurde abgewogen, in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und anschließend 1 ml DMSO auf 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt, sodass eine RSV-Konzentration von 10^{-3} M erreicht wurde. Für eine 10^{-6} -molare (10^{-6} M) RSV-Lösung wurde 20 μ l RSV zu 20 ml M2-Medium dazugegeben.

In der **3. Versuchsreihe** wurde die Wirkung von RSV an gestressten Hornhäuten untersucht. Hierfür wurden zu Beginn der Versuchsreihe Hornhautpaare verwendet. Ein Hornhautpaar bestand jeweils aus der rechten und linken Hornhaut des gleichen Spenders. Bei der Verwendung von Hornhautpaaren galten weiterhin die festgelegten Einschluss- und Qualitätskriterien. Der Einschluss geeigneter Hornhautpaare in die Studie gestaltete sich äußerst schwierig und hatte eine lange Sammelzeit zur Folge. Zum einen gab es einen Mangel an wissenschaftlich verfügbaren Hornhautpaaren und zum anderen sahen wir Diskrepanzen in der Qualität der paarigen Hornhäute. Die meisten zur Transplantation nicht freigegebenen Hornhäute fanden aufgrund mangelhafter Endothelzellqualität auch keine Verwendung in der Studie. Retrospektiv lässt sich sagen, dass vor allem Hornhäute mit positiver Spenderserologie die Qualitätskriterien optimal erfüllen und Verwendung in dieser Versuchsreihe fanden. Aufgrund der Überschreitung eines orientierend festgelegten Zeitplans in Bezug auf die Sammelzeit geeigneter Hornhautpaare wurde im Verlauf der dritten Versuchsreihe vom ursprünglichen Versuchsaufbau abgewichen und dazu übergegangen die eingeschlossenen Hornhäute zu halbieren. Eine Hornhauthälfte wurde jeweils der Wirkungs- und der Kontrollgruppe zugeordnet.

In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt sieben Hornhäute, davon drei Hornhautpaare und eine einzelne Hornhaut über eine Zeitspanne von acht Tagen untersucht. Jede Hornhaut wurde unter sterilen Bedingungen mit einer chirurgischen Schere (siehe Tabelle 1, Kapitel 1.8) vorsichtig halbiert. Die Hornhauthälften wurden anschließend in ein Infusionsfläschchen mit 20 ml serumhaltigem M2-Medium gegeben und zufällig einer Gruppe zugeordnet. Gruppe 1 wurde als Kontroll-Gruppe festgelegt und Gruppe 2 als RSV-Gruppe. Die Hornhäute in Gruppe

1 wurden in 20 ml serumhaltigen M2-Medium gesetzt und 20 µl PBS zugegeben. In Gruppe 2 wurden die Hornhäute in 20 ml serumhaltigen M2-Medium gesetzt und 20 µl RSV-Lösung dazu gegeben.

Jeweils an den Tagen 1, 2, 3, 4, 6 und 8 wurde die Endothelzellschicht der Spenderhornhaut lichtmikroskopisch untersucht, das Bild dokumentiert und die Endothelzellzahl ausgezählt.

Im Folgenden ist der zeitliche Ablauf der **3. Versuchsreihe** dargestellt:

- Tag 1 Start der Versuchsreihe: *Entnahme der Hornhaut aus Kulturmedium M1, Teilung der Hornhaut und Umsetzung der Hornhauthälfte in Medium M2.*
- Tag 2 Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellqualität und Dokumentation der Endothelzellzahl, anschließend Zugabe von 20 µl RSV-Lösung zu Gruppe 2 und 20 µl PBS zu Gruppe 1*
- Tag 3 2. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Hornhautqualität, erneute Endothelzellzählung und anschließende Inkubation der Hornhautsegmente in Gruppe 1/2 mit 400 µM H₂O₂ für 30 Minuten in einem separaten Infusionsfläschchen.*
- Tag 4 3. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung*
- Tag 6 4. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung*
- Tag 8 5. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung*

Eine Hornhaut ist aufgrund fortgeschrittenem rapiden Zelluntergang und hoher Nekroserate bereits an Tag 2 ausgeschieden und wurde nicht weiter mikroskopisch untersucht.

3.7.4.3 Wirkungsstudie von RSV und DMSO - 4. Versuchsreihe

Um zu untersuchen, ob die Substanzen RSV und DMSO einen toxischen Effekt auf korneale Endothelzellen haben und ebenso zu Endothelzellverlust führen, wurde eine **4. Versuchsreihe** angeschlossen. In dieser Versuchsreihe wurde die Hornhaut gedrittelt, je ein Hornhautfragment einer Gruppe (Gruppe 1 = Kontrollgruppe, Gruppe 2 = DMSO, Gruppe 3 = RSV) zufällig zugeordnet und den Verlauf der Endothelzellzahl über 28 Tage beobachtet.

Die Kontrollgruppe wurde ohne jegliche Zusätze in 20 ml serumhaltigen M2 für vier Wochen kultiviert. Die Mikroskopie der Hornhäute erfolgte an Tag 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22 und 29.

Gruppe 2 erhielt 20 µl in PBS verdünntes DMSO [Konzentration: 10^{-1}] zu 20 ml serumhaltigen M2 [endgültige Konzentration: 10^{-4}] und in Gruppe 3 wurde dem Hornhautdrittel, welches in 20 ml serumhaltigen M2-Medium kultiviert wird 20 µl RSV in DMSO [Konzentration: 10^{-2}] gelöst zugegeben. Die endgültige Konzentration von RSV betrug 10 µM.

Aufgrund der Zugabe von RSV bzw. DMSO wurde in keiner Gruppe innerhalb der 4 Wochen ein Mediumwechsel durchgeführt.

- Tag 1 Start der Versuchsreihe: *Entnahme der Hornhaut aus Kulturmedium M1, Hornhautdrittelung und Gabe in jeweils ein Infusionsfläschchen mit serumhaltigem M2 Medium.*
- Tag 2 1. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellqualität und Dokumentation der Endothelzellzahl in allen Gruppen, anschließend Zugabe von 20 µl RSV-Lösung zu Gruppe 3 und 20 µl DMSO-Lösung zu Gruppe 2, Gruppe 1 blieb unverändert*
- Tag 4 2. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Hornhautqualität und erneute Endothelzellzählung in allen Gruppen*
- Tag 6 3. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung in allen Gruppen*
- Tag 8 4. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung in allen Gruppen*
- Tag 15 5. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung in allen Gruppen*
- Tag 22 6. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung in allen Gruppen*
- Tag 29 7. Mikroskopische Untersuchung: *Beurteilung der Endothelzellschicht und Endothelzellzählung in allen Gruppen*

3.7.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium-Färbung

Störungen in der Redoxhomöostase führen zu erhöhten Spiegeln an reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu sogenannten oxidativen Stress. Dieser gilt als ein relevanter pathophysiologischer Mechanismus der kornealen Endothelzellschädigung. Diese können mit Hilfe der Substanz Dihydroethidium (DHE) quantifiziert und mikroskopisch dargestellt werden.

DHE ist ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert wird, wodurch unter anderem das fluoreszierende Ethidium (E^+) entsteht (150, 151) und daran die intrazelluläre ROS-Produktion bewertet werden kann. Ethidium interagiert mit der DNA, wodurch es zu einer intensiv roten Fluoreszenz kommt. Mit Hilfe eines standardisierten Algorithmus kann die Emission der resultierenden Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert und der oxidative Stress in den kultivierten cornealen Endothelzellen ermittelt werden. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität gelang wiederum mit der Bildbearbeitungssoftware Image J. Die gemäß des Versuchsaufbaus der 3. Versuchsreihe vorbereiteten Hornhäute wurden an Tag 3 unmittelbar nach H_2O_2 -Exposition (Kapitel 3.7.4.2) in einem Kryomold in Tissue- Tek O.C. T. eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C kryokonserviert. Folgend wurden durch wissenschaftliche Mitarbeiter im Bereich der Experimentellen Ophthalmologie der Augenklinik Mainz die weiteren Schritte fortgeführt. Zunächst wurden Kryoschnitte ($10\text{ }\mu\text{m}$ dick) mit einer Kryomaschine angefertigt und auf einem Objektträger aufgebracht. Anschließend wurde in einer abgedunkelten Feuchtkammer die fotosensible DHE-Lösung (1 ml pro Objektträger) aufgetragen. Es erfolgte die Inkubation in einer 37 °C warmen Feuchtkammer für 30 Minuten. Die Fluoreszenzintensität konnte anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TS 100; Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN) über eine digitale Mikroskopkamera DS-Fi1-U2 (Nikon) und einem ELWD 20x/0,45 S Plan Fluor Ph1ADM-Objektiv (Nikon) visuell erfasst werden. Abschließend erfolgte die Aufnahme mittels der Bildgebungssoftware NIS Elements (Nikon, Version 1.10 64 bit; Einstellung: TRITC Filter, Belichtung 330 ms, Steigerung 2x), sowie die Messung der Fluoreszenzintensität mit der ImageJ-Software.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die ausgewerteten Daten der Endothelvaluierung graphisch dargestellt. Die mikroskopische Betrachtung und Ablichtung der Endothelzellen erfolgte jeweils vor Kultivierung und in einem festgelegten zeitlichen Intervall (siehe Kapitel 2.7.4. Methoden). Die Beurteilung der Endothelzellmorphologie und Dokumentation der Nekroserate erfolgte nur in der 2. Versuchsreihe.

In die Beurteilung der Hornhaut ging jeweils der Mittelwert aus 5 Messungen unterschiedlicher Lokalisation je Hornhaut und pro Messzeitpunkt ein.

4.1 Statistische Analyse

Alle Bilddateien wurden mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ ausgewertet. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden die pro Hornhaut erfassten Ergebnisse der Endothelzellzählung in einem arithmetischen Mittel zusammengefasst.

Die statistische Auswertung wurde mit der Statistiksoftware GraphPad PRISM 9 durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4.2 Induktion von oxidativem Stress mittels H_2O_2

Zunächst erfolgte eine Verdünnungsreihe (1. und 2. Versuchsreihe), um die optimale Konzentration und Inkubationszeit von H_2O_2 gegenüber kultivierten Spenderhornhäuten zu bestimmen, um für die anschließende Versuchsreihe mit RSV einen signifikanten Endothelzellverlust zu provozieren und so dessen Wirksamkeit zu untersuchen. Die Ergebnisse waren Voraussetzung für den weiteren experimentellen Versuchsaufbau und sind in Abbildung 12 dargestellt.

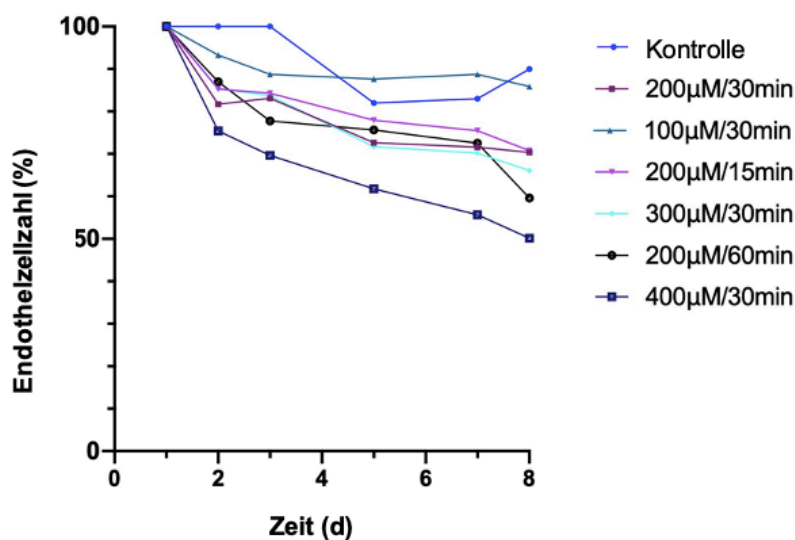


Abbildung 12: Graphische Darstellung der zeitlichen Zelldichteveränderung über die Kulturzeit und entsprechend der Konzentration sowie Expositionszeit, $n = 1$ pro Gruppe

In der Grafik (Abbildung 12) ist eine zeitliche Abnahme der Endothelzelldichte in den unterschiedlichen Expositionen gegenüber Wasserstoffperoxid zu erkennen. Es zeigte sich in allen 6 Gruppen ein stetiger Endothelzellverlust, der jedoch anhängig von H_2O_2 -Konzentration sowie der Expositionszeit zunahm. Der gewünschte Endothelzellverlust von $\geq 45\%$ und $\leq 55\%$ wurde bei einer H_2O_2 -Konzentration von $400\ \mu M$ und einer Inkubationszeit von 30 min erreicht. Der unterste Graph stellt den gewünschten Verlauf der EZD dar und wurde als Standard-Konzentration für die folgenden Versuche mit RSV festgelegt.

4.3 Wirkung der verwendeten Substanzen (RSV und DMSO)

In der 4. **Versuchsreihe** wurde die Wirkung der verwendeten Substanzen auf korneales Endothel untersucht und ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Es zeigte in einem ungepaarten T-Test kein statistisch signifikanter Unterschied im Verlauf der Endothelzellzahl zwischen den Gruppen. Anhand der erfassten Mittelwerte im zeitlichen Intervall lässt sich erkennen, dass über eine Kultivierungszeit von 4 Wochen in allen Gruppen ein stetiger Endothelzellverlust zu verzeichnen ist, sodass ein protektiver Effekt durch die Anwendung von RSV nicht ausgeprägt zu sein scheint (F (DFn; DFd) = 1,425; $p > 0,05$). Im Umkehrschluss können wir jedoch annehmen, dass durch die Anwendung von DMSO und RSV keine negativen bzw. toxischen Effekte auf die Endothelzelldichte entstanden. Aufgrund des fehlenden Unterschiedes wurden die molekularen Mechanismen bei dieser Versuchsreihe nicht weiterverfolgt.

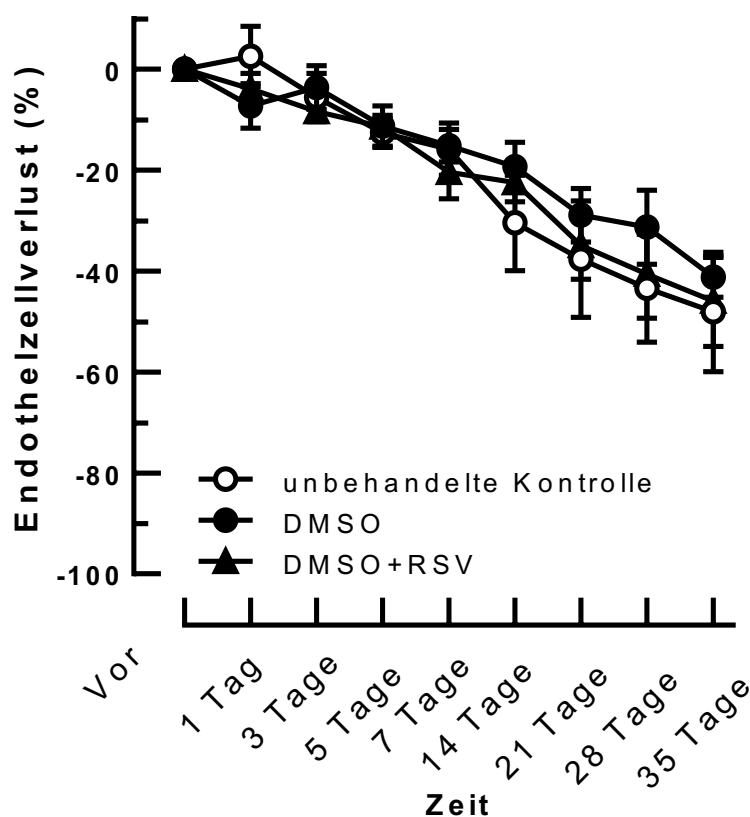


Abbildung 13: Darstellung der zeitlichen Zelldichteänderung in den unterschiedlichen Gruppen (Kontrolle, DMSO und DMSO + RSV). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit DMSO und RSV vorbehandelten Gruppe zeigt sich ein stetiger Endothelzellverlust. Statistisch bestand kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Endothelzelldichte zwischen den Gruppen, $n=7$ pro Gruppe.

4.4 Effekt von RSV auf korneale Endothelzellen

Um den Einfluss von RSV auf die Endothelzelldichte nach vorheriger Induktion oxidativen Stresses mit H_2O_2 zu untersuchen, wurde der Verlauf des durchschnittlichen prozentualen Abfalls der EZD zum Ausgangswert an 5 Messpunkten der Hornhaut bestimmt. Der mittlere gesamte Endothelzellverlust in Zellen pro mm^2 zeigte sich statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) bei den Hornhautfragmenten, die vor der Stressprovokation mit RSV behandelt wurden. Im Vergleich ist in der unbehandelten Kontrollgruppe über den gleichen Beobachtungszeitraum und bei einheitlichen Messzeiten ein größerer Endothelzellverlust zu beobachten. Die grafische Darstellung der Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

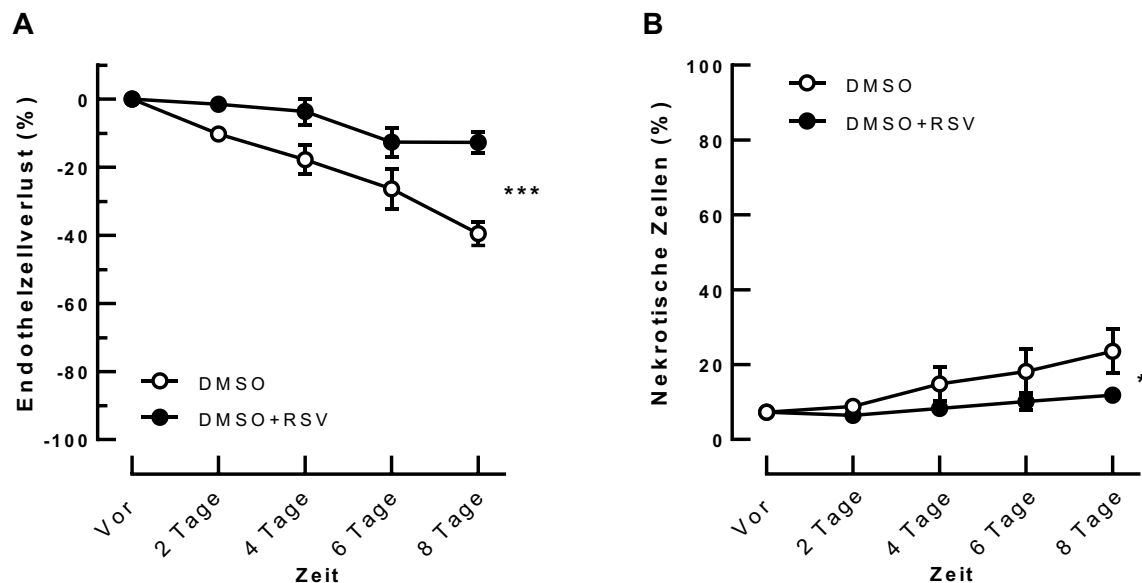


Abbildung 14: Darstellung der zeitlichen Zellzahlveränderung und Nekroseraten des Hornhautendothels in der Wirkungs- und Kontrollgruppe über 8 Tage nach Inkubation mit H_2O_2 . Die Wirkungsgruppe, die mit RSV vorbehandelt wurde, weist eine höhere Zelldichte (A) sowie eine verringerte Nekroserate (B) als die Kontrollgruppe auf. Statistisch bestand ein signifikanter Unterschied in der Endothelzellendichte und Nekroserate zwischen beiden Gruppen.

Um oxidativen Stress zu quantifizieren, haben wir die In situ-Färbung mittels DHE am Gewebeschnitt verwendet. Die Hornhäute, die mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt wurden und als Kontrolle dienten, wiesen in der Endothelzellschicht eine starke Rotfärbung auf, ein Indikator für oxidativen Stress. Im Gegensatz dazu wiesen Hornhäute, die mit RSV gelöst in DMSO vorbehandelt wurden, eine verminderte Rotfärbung auf, was auf geminderten oxidativen Stress hindeutet. Die Ergebnisse der DHE-Färbungen sind in Abbildung 15 dargestellt.

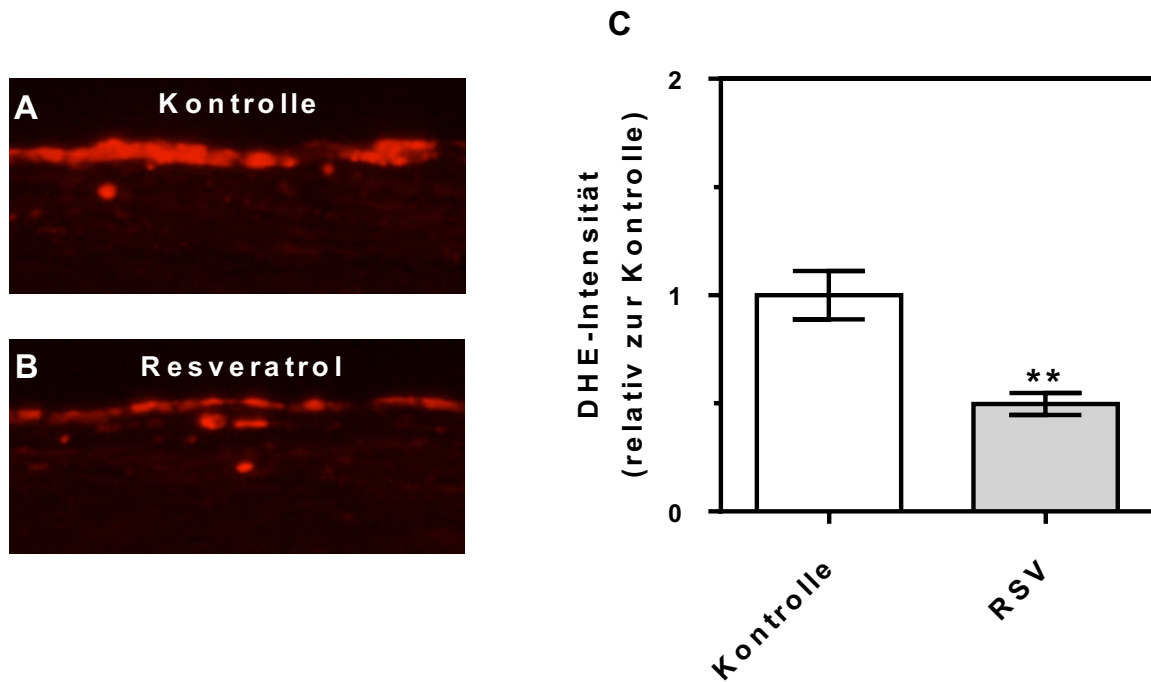


Abbildung 15: Darstellung der Dihydroethidium-Leuchtintensität des Hornhautendothels unmittelbar nach H_2O_2 -Exposition. Die Kontrollgruppe, die ohne RSV und nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt wurde (A) weist eine deutlich höhere Leuchtintensität auf als die mit Resveratrol, gelöst in DMSO, vorbehandelte Gruppe (B). Statistisch bestand ein signifikanter Unterschied der Leuchtintensität zwischen beiden Gruppen (C) $**p=0,0014$, ungepaarter T-Test, $n=7$ pro Gruppe).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Erkenntnisse

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Zugabe von RSV den provozierten oxidativen Stress und den damit verbundenen Endothelzellverlust mindert. In der standardisierten Kultivierung der Hornhaut, unter den Bedingungen wie wir sie in der HHB Mainz vorfinden, jedoch keinen signifikant positiven Effekt auf die Endothelzellzahl hat und es im zeitlichen Verlauf weiterhin zu einem stetigen Endothelzellverlust kommt. Die Differenz der relativen Zellverluste in der Gruppe mit dem alleinigen Zusatz von RSV, von DMSO als auch in Kombination und der Kontrollgruppe sind nicht signifikant.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Kornealer Endothelzellverlust durch oxidativen Stress

Die Mechanismen des kornealen Endothelzellverlustes waren in den letzten Jahren Basis einzelner Untersuchungen. Ein Anstieg an ROS wurde als möglicher Grund für apoptotische Veränderungen in kornealen Endothelzellen gefunden (152). ROS sind eine Gruppe instabiler und gewebezerstörender Moleküle, welche Apoptose und Destruktion kornealer Endothelzellen bewirken können. Die Wirkung von ROS sind weitreichend. Drei Reaktionen sind besonders relevant für die Zellschädigung: Lipidperoxidation von Membranen, oxidative Modifikation von Proteinen und oxidative Schäden der DNA. Der erhöhte ROS-Spiegel reagiert mit Lipiden in den Zell- und Mitochondrienmembranen, verändert deren Permeabilität und Integrität, was zu einer reversiblen oder irreversiblen Zellschädigung führt (153). ROS entstehen als Beiprodukte des zellulären Stoffwechsels, durch die Reaktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, siehe dazu auch Kapitel 1.5 - Antioxidative Abwehrmechanismen der Hornhaut. H_2O_2 ist ein wichtiger Regulator verschiedenster zellulärer Signalwege, so führen beispielsweise Zytokine oder Wachstumsfaktoren zu einer gesteigerten Bildung von H_2O_2 . Darüber hinaus ist Wasserstoffperoxid ein starkes Oxidationsmittel (154) und führt in hohen Konzentrationen zu oxidativen Stress. Freie Radikale und oxidativer Stress wurde in unterschiedlicher Hinsicht, ob beim normalen Altern oder der Pathogenese verschiedenster Krankheiten als gemeinsamer Weg für den Zelltod und Zellfunktionsstörung erkannt. Er spielt unter anderem eine Rolle bei der Ätiologie von hypoxischen Schäden, Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer. Oxidativer Stress ist auch an der Pathogenese von Augenkrankheiten beteiligt, wie dem senilen Katarakt, der altersbedingten Makuladegeneration, Uveitis, Keratitis ect. In der Literatur gibt es einzelne ophthalmologische experimentelle Studien, die den durch oxidativen

Stress vermittelten Zelltod untersuchen. In einem Studienmodell der Universität Tübingen von *Hurst et al.* wurden Netzhäute über drei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 in Vollmedium verdünnt behandelt. Anschließend war ein signifikanter Ganglienzellverlust gegenüber der unbehandelten Retina zu beobachten (155, 156). Außerdem wurden in allen H_2O_2 -behandelten Gruppen in Folge erhöhten oxidativen Stresses Apoptosemarker nachgewiesen. Damit wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid zur Neurodegeneration beiträgt und gleichzeitig ein Studienmodell mit der Anwendung von Wasserstoffperoxid in Gewebekultur aufgezeigt. Wasserstoffperoxid diffundiert leicht durch Zellmembranen, so dass es sich gut als Zusatz in Nährmedium anbietet (93, 156). In einer Untersuchung an Hornhautgewebe von Kaninchen beschreiben N.C. Joyce et al. die Wirkung von oxidativem Stress auf DNA-Schädigung. In einem ähnlichen Versuchsaufbau inkubierten sie Hornhautgewebe über 4 Stunden in 0 bis 500 μM Konzentrationen Wasserstoffperoxid, das in Kulturmedium zugegeben wurde. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Exposition gegenüber steigenden H_2O_2 -Konzentrationen eine erhöhte oxidative Schädigung der mitochondrialen und nukleären DNA verursacht (157). Anhand der Studien von N.C. Joyce und J. Hurst lässt sich erkennen, dass in Gewebekultivierung oxidativer Stress zu einem Untergang verschiedenster Gewebe führen kann. Die in dieser Dissertation verwendete Methode bestätigte ebenfalls die Ergebnisse, eine kurzzeitige Exposition gegenüber einer H_2O_2 -Konzentration von $> 100 \mu\text{M}$ führte zu einem Abfall der Endothelzellichte der Spenderhornhaut. Je höher die H_2O_2 -Konzentration und je länger die Expositionszeit, desto höhere Endothelzellverluste (EZV) stellten sich im gleichen Beobachtungszeitraum ein. Die Konzentration von 400 μM Wasserstoffperoxid verzeichnete die gewünschte Zellviabilität von etwa 50 % im Beobachtungszeitraum. Niedrige Konzentrationen zeigten keinen wesentlichen Endothelzellverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Endothelzellichte in der unbehandelten Kontrollgruppe verzeichnete ebenfalls Endothelzellverluste, bei weitem jedoch nicht in solchem Ausmaß wie in den Expositionsgruppen mit Wasserstoffperoxid. Daraus lässt sich annehmen, dass hohe Konzentrationen von H_2O_2 nicht mehr durch oben genannte antioxidative Abwehrmechanismen der Zelle kompensiert werden können. Es folgt ein irreversibler Zell- und Gewebeschaden. Aufgrund unserer ersten Studienergebnisse und weiterer wissenschaftlicher Literatur haben wir die Wasserstoffperoxid-vermittelte Oxidation als *in-vitro*-Modell etabliert, um den direkten Einfluss oxidativen Stresses sowie die Wirksamkeit antioxidativer Substanzen auf die Überlebensrate kornealer Endothelzellen zu untersuchen.

5.2.2 Resveratrol und seine Wirkung auf korneales Endothel in Kultivierung

Das Hornhautendothel spielt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz. Seine Dysfunktion ist eine Hauptursache für Hornhautödeme und Sehstörungen, die eine perforierende oder lamelläre Keratoplastik erforderlich machen. Für eine gute Transplantatqualität und den späteren Erfolg der Keratoplastik ist eine hohe Endothelzelldichte wünschenswert und auch maßgeblich. Etwa 20 % der entnommenen Hornhautspenden müssen wegen eines primär schlechten Hornhautbefundes verworfen werden (75, 158). Der relative Verlust an Endothelzellen der Hornhaut während der Kultur erniedrigt weiter den Prozentsatz der zur Verfügung stehenden Transplantate. Daher ist es umso wichtiger, nach Methoden zu suchen, die die Qualität der Hornhäute verbessern und diese haltbarer bei der Kultivierung machen. Resveratrol ist ein wichtiges natürlich vorkommendes Polyphenol, das antioxidative, antiinflammatorische und antiproliferative Aktivitäten zeigt. Es wird angenommen, dass der Konsum von RSV eine Reihe potenzieller gesundheitlicher Vorteile durch die Reduktion oxidativen Stresses mit sich bringt. Oxidativer Stress und Entzündungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten altersbedingter Augenerkrankungen (159). Präklinische Studien zeigten, dass RSV bei okulären Erkrankungen, insbesondere der AMD (160), dem Glaukom (132), der Katarakt (161) und der Diabetischen Retinopathie (162) positive Wirkungen zeigt. Seine Rolle bei der Hornhauttransplantation wurde noch nicht dokumentiert. Studien zu Erkrankungen des kornealen Endothels aufgrund erhöhten oxidativen Stresses wie beispielsweise bei der Fuchs-Endotheldystrophie und der Anwendung von RSV konnten ebenfalls nicht herangezogen werden. Unter normalen Bedingungen entfernen antioxidative Enzyme wie Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-S-Transferase zelluläre ROS, die während der mitochondrialen oxidativen Atmung produziert werden. Wenn es wie in unserem Modell jedoch zu einer Stimulation durch schädliche Faktoren wie chemische Reagenzien kommt, werden die Abwehrsysteme überlastet, was zu einer übermäßigen Ansammlung von ROS und folglich zu oxidativem Stress führt. Unsere Studienergebnisse zeigen, dass die Anwendung von RSV in der Kultivierung von Spenderhornhäuten, die erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt waren einen positiven Effekt auf die endotheliale Zelldichte hat. Die Endothelzelldichte zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe über den zeitlichen Verlauf eine signifikant geringere Abnahme, was uns schlussfolgern lässt, dass RSV die übermäßige Ansammlung von ROS verhindert. Die Resultate anderer Studien an okulären Zellen sprechen ebenso dafür: In einer Studie an retinalen Pigmentepithelzellen konnte gezeigt werden, dass RSV die H₂O₂-induzierte intrazelluläre Oxidation hemmt und die Hochregulierung von Genen, die am zellulären Überleben beteiligt sind, aktiviert (138). Insgesamt kam es hier durch die Zugabe von RSV in einer Konzentration von 100 µmol/l zur Reduktion der basalen und H₂O₂-induzierten ROS-Akkumulation in retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) und einer Verringerung des H₂O₂-

induzierten Zelltodes (138). RSV fungierte in diesem Zusammenhang als effektiver Radikalfänger von ROS, einschließlich Singulett-Sauerstoff und Superoxid-Anionen (163, 164). In H_2O_2 - und O_2^- -Radikalfängerexperimenten erreicht die Abfangeffizienz von 30 $\mu g/ml$ RSV 19,5 %, was darauf hindeutet, dass RSV eine starke Effizienz zum Abfangen freier Radikale hatte (165) (166). Was auch in seiner chemischen Struktur, mit der Hydroxylgruppe am Ring und der konjugierten Doppelbindung begründet ist (166). Palsamy et al. berichteten über Streptozotocin-induzierten oxidativen Stress bei diabetischen Ratten, bei denen die gemessenen O_2^- - und OH-Spiegel im Nierenparenchym hoch waren und nach RSV Gabe signifikant reduziert, was ebenfalls darauf hindeutet, dass RSV freie Radikale effektiv eliminiert (167). In einer weiteren Studie wurde Resveratrol in Kulturmedium gegeben und hatte bei einer Konzentration von 25 - 100 μM keine zytotoxische Wirkung, zeigte aber eine protektive Wirkung gegen Wasserstoffperoxid-induzierte Zytotoxizität. Nach der Vorbehandlung mit RSV kam es zu einer signifikanten Hemmung der intrazellulären ROS-Erzeugung, was wiederum die Hypothese stützt, dass Resveratrol auch zur antioxidativen Abwehr beitragen kann, indem es die ROS direkt in RPE-Zellen abfängt. Zudem induzierte die Inkubation mit Resveratrol einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der Superoxiddismutase-, Glutathionperoxidase- und Katalase-Aktivitäten. Darüber hinaus erhöhte Resveratrol den Gehalt an reduziertem Glutathion sowohl unter basalen als auch unter oxidativen Stressbedingungen signifikant (148). Ähnliche Effekte wurden in Linsenfaserzellen beobachtet. Diese sind, wie auch das korneale Endothel, sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress, da die Faserzellen nicht erneuerbar sind. In einer Studie an humanen Linsenepithelzellen haben Zheng et al. gezeigt, dass RSV den Zelltod sowie die Akkumulation von ROS nach einem oxidativen Angriff durch H_2O_2 reduziert, indem es die Enzymexpression der SOD-1 und Katalase proportional zur Konzentration von RSV steigert (168). Zusammenfassend lässt sich folglich feststellen, dass RSV sowohl als direkter Radikalfänger als auch über eine gesteigerte Expression antioxidativer Enzyme eine positive Wirkung auf das zelluläre Redoxgleichgewicht hat. Diese Maßnahmen begrenzen die Schädigung durch erhöhten oxidativen Stress. Doch welche Rolle spielt RSV unter standardisierten Kultivierungsbedingungen? Unsere Studienergebnisse zeigen, dass RSV in der Hornhautkultivierung unter den standardisierten Bedingungen, wie wir sie in der Hornhautbank Mainz vorfinden, keinen signifikant positiven Einfluss auf die Endothelzellviabilität hat. Über die gesamte Kultivierungszeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Endothelzelldichte zwischen Interventions- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Schlussfolgern könnte man daraus, dass RSV vor allem eine hohe Potenz hat erhöhten oxidativen Stress abzufangen, jedoch in der Kultivierung weitere Faktoren für den stetigen Zellverlust ursächlich sind. Aus unseren Ergebnissen lässt sich ebenso schließen, dass RSV in der von uns verwendeten Konzentration (1 μM) keine zytotoxische Auswirkung auf korneales Endothel hat. In den

unterschiedlichen Gruppen der 4. Versuchsreihe trat kein signifikanter Endothelzellverlust über den Beobachtungszeitraum auf (siehe dazu auch Kapitel 3.4). In der Literatur ist jedoch auch eine prooxidative und zelltoxische Wirkung von RSV auf Endothel beschrieben (169), (170) (171, 172). Resveratrol hat je nach Konzentration zweiphasige Eigenschaften (171). Eine Studie zeigte, dass RSV in hohen Dosen pro-apoptotische Aktivität hat, während bei einer niedrigeren Konzentration die antioxidative Wirkungen überwiegt. In ähnlicher Weise führte eine chronische Behandlung von Endothelzellen in Kultur mit RSV von 10 μM in Akkumulation zu einer erhöhten ROS-Produktion durch die NOX-Isoformen 1 und 4 zu einem Stillstand des Zellzyklus und einer Seneszenz. Ob RSV in Endothelzellen als Pro- oder Antioxidans wirkt, ist folglich von der angewendeten Dosis und dem Behandlungsschema abhängig. In unserer wissenschaftlichen Arbeit wird zu Vergleichsstudien (138, 148, 171) eine äußerst geringe RSV-Konzentration (1 μM) verwendet und zu Beginn der Versuchsreihe dem Kulturmedium einmalig zugesetzt, sodass wir, auch unter Einbeziehung unserer wissenschaftlichen Ergebnisse und der Vergleichsliteratur, eine antioxidative positive Wirkung von RSV annehmen. Siehe dazu auch Kapitel 4.5, in dem die Zugabe von RSV in Kulturmedium mit weiteren Studien verglichen wird.

5.2.3 DMSO und seine Wirkung auf corneales Endothel

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine organische polare chemische Verbindung, die in der wissenschaftlichen Literatur viele Kontroversen ausgelöst hat. Es ist ein vielseitiges aprotisches Lösungsmittel, das eine Vielzahl von schwerlöslichen polaren und unpolaren Molekülen solubilisieren kann und deshalb häufig als Lösungsmittel von kleinen hydrophoben Substanzen wie beispielsweise Arzneimittelmolekülen Verwendung findet. Dies hat zusammen mit seiner offensichtlich geringen Toxizität bei Konzentrationen $< 10\%$ zu seiner allgegenwärtigen Verwendung und weit verbreiteten Anwendung in Kryokonservierung, zellbiologischen Therapien oder als Vehikel in *In-vitro* und *In-Vivo* Studien geführt (173, 174). Seine physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie die zugeschriebenen zellulären Wirkungen wie etwa als Radikalfänger (175),(176) sind bisher jedoch unvollständig verstanden. Zudem ist die Studienlage zur Toxizität von DMSO sehr widersprüchlich. Zu den Eigenschaften, die als besonders wichtig für seine therapeutische, jedoch auch toxische Wirkung angesehen werden, gehört seine schnelle und verstärkte Penetration anderer Substanzen durch biologische Membranen. Die Kombination von DMSO mit anderen Substanzen bildet wahrscheinlich das größte toxische Potenzial. In der 3. Versuchsreihe testeten wir isoliert DMSO und in Kombination mit RSV auf Zelltoxizität, mit dem Ergebnis, dass innerhalb der 28 Tage Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied in der Endothelzellverlustrate zwischen den einzelnen Gruppen, eingeschlossen der Kontrollgruppe gesehen wurde. Eine Untersuchung auf molekularer Ebene fand jedoch nicht statt. Die in

unserem Modell angewendeten DMSO-Konzentrationen von 0,0001 bis 0,00001 % waren jedoch im Vergleich zu den herangezogenen Studien sehr gering. Eine vergleichbare Studie, in der die Verträglichkeit von DMSO an kultivierten Kaninchenhornhäuten untersucht wurde, kommt zu einem kongruenten Ergebnis. Bei einer Verdünnung unter 1 % DMSO kam zu keiner Veränderung des Zellbildes. Erst bei höheren Konzentrationen traten osmotisch bedingte, bis zu einem gewissen Grad reversible Zellveränderungen auf (177). Dem gegenüber stehen die Studienergebnisse von Cao et al., die die Anwendung von DMSO in der Kultivierung humaner Linsenepithelzellen untersuchten. Sie zeigten, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe bei einer Endkonzentration von 1 % DMSO in Medium die Lebensfähigkeit der Zellen um > 10 % abnahm und diese ein höheres Maß an Apoptose zeigten. Auch die Studiengruppe von Galvao et al., äußern Sicherheitsbedenken hinsichtlich der Verwendung niedriger Konzentrationen von DMSO als Lösungsmittel. Ihre Ergebnisse zeigen, dass selbst niedrige Endkonzentrationen von 0,1 % DMSO in der Retina *in vivo* zelltoxisch waren und eine signifikante retinale Apoptose induzierten. Sperling und Larsen untersuchten humane Hornhautspenden nach einer 20 - 28 -stündigen Inkubation mit 2 - 8 % DMSO. Sie stellten fest, dass DMSO bei 31 °C latente Zellschäden verursacht. In hypothermer Konservierung bei 4 °C wurde keine Zellschädigung gefunden, wenn DMSO in essentiellm Minimalmedium plus Dextran gelöst wurde oder wenn DMSO in Humanalbumin plus Saccharose gelöst wurde (178).

DMSO wird aufgrund seiner membrandurchdringenden und wasserverdrängenden Eigenschaften häufig in der Kryokonservierung von Zellen oder Geweben verwendet und dementsprechend auf seine Eignung hin untersucht. In weiteren Studien wurde DMSO präventiv als Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung von Spenderhornhaut eingesetzt und ein positives Outcome des kornealen Endothels beschrieben (174, 179, 180). Es gibt einige Studien, die die zellprotektive Wirkung von DMSO in kryokonservierten Hornhäuten untersucht, seine Rolle in der Gewebekultivierung bei physiologischen Temperaturen ist bisher unzureichend beschrieben. Abschließend lässt sich festhalten, dass aufgrund der aktuellen Studienlage eine sichere Aussage zur Toxizität von DMSO nicht getroffen werden kann. Wir nehmen jedoch in Zusammenschau der zitierten Studien und unserer Ergebnisse keine zelltoxischen Effekte in der angewendeten DMSO - Konzentration in einer standardisierten Hornhautkultivierung an. Bei der Anwendung von DMSO wird in der Literatur nicht nur auf zelltoxische Effekte verwiesen, sondern es wird Dimethylsulfoxid ebenfalls eine zellprotektive Wirkung zugeschrieben. Eine schützende Wirkung von DMSO gegen oxidative Schäden wurden im Modell von Eierstöcken, Hoden und Rattenhirnen nachgewiesen (181),(182),(183). Túnez et al. fanden geringe protektive Effekte von Dimethylsulfoxid auf die Lipidperoxidation in neuronalen und hepatischen Zellen, die erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt wurden (184). Zu einem ähnlichen Schluss kamen Sanmartín-Suárez et al., die die antioxidativen

Eigenschaften von DMSO auf die Wasserstoffperoxid-induzierte Lipidperoxidation als auch die Proteinoxidation in Rattenhirnen untersuchten. Sie schreiben, dass es durch die Anwendung von DMSO zu einer Reduktion der Lipidperoxidation kommt (183). Die antioxidativen Eigenschaften von DMSO wurden früher allein seiner direkten Wirkung als Radikalfänger zugeschrieben. Die Studiengruppe um Wang Man et al. zeigte mit ihren Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten jedoch, dass die zytoprotektive Wirkung von DMSO teilweise durch eine gesteigerte Expression eines starken antioxidativen Enzyms, der Häm-Oxygenase-1 beruht (185). Dafür wurden kultivierte Kardiomyozyten ebenfalls mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen behandelt und 6 Stunden mit und ohne DMSO vorbehandelt. H_2O_2 verringerte auch hier die Lebensfähigkeit der Zellen bei einer Konzentration von 100 μM signifikant, was durch eine DMSO-Vorbehandlung umgekehrt wurde. Betrachten wir diese Literaturergebnisse nun in Bezug auf unsere eigenen Studienergebnisse, so könnte man im weitesten Sinne schlussfolgern, dass DMSO in der verwendeten Konzentration keine signifikanten zellprotektiven Effekte auf korneales Endothel in standardisierter Hornhautkultivierung zeigte. Eine weitere Versuchsreihe an, mit DMSO vorbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-gestressten kornealen Endothel ließe jedoch durchaus positive antioxidative Effekte erwarten.

5.3 Diskussion der angewendeten Methoden

Molekulare Ursachen, denen die Pathogenese vieler ophthalmologischer Erkrankungen zugrunde liegt, sind noch nicht vollständig geklärt. Um die stattfindenden pathologischen Veränderungen zu verstehen, sind jedoch zuverlässige Modelle bzw. Simulationen erforderlich die Augenkrankheiten, in unserem Fall Endothelzellverlust provozieren. Zudem bedarf es einer Weiterentwicklung von Methoden, um neuartige therapeutische Ansätze untersuchen zu können. In der hiesigen Studie wurden in vier experimentellen Versuchsreihen Daten zur EZD in Spenderhornhäuten erhoben und anschließend analysiert. Im Folgenden sollen die Studienmodelle und Daten wichtiger Vergleichsstudien aufgeführt und mit unseren Methoden diskutiert werden.

Im nachfolgenden Abschnitt soll vor allem auf das Studiendesign und die Methodik kritisch eingegangen werden, um mögliche Grenzen und limitierende Faktoren dieser wissenschaftlichen Arbeit aufzuzeigen.

5.4 Verwendung von Spenderhornhäuten

Zur Methode der Datenerhebung sind einige Aspekte zu nennen, die eine Limitierung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse darstellen. Es muss bedacht werden,

dass wir mit humanen Spenderhornhäuten arbeiten, bei denen große individuelle Unterschiede bestehen, selbst zwischen spendergleichen Hornhautpaaren und Variablen wie Spenderalter, Todesursache und der mechanische Entnahmeprozess des Hornhauttransplantats ebenfalls Auswirkungen auf die Qualität der Hornhäute haben können. Um den Einfluss dieser Variablen auf unsere Daten zu minimieren und auch aufgrund der geringen Anzahl an zur Verfügung stehenden Hornhäuten haben wir uns entschieden, die Hornhäute unter größter Sorgfalt und sterilen Bedingungen zu teilen. Die einzelnen Hornhautfragmente wurden nach dem Zufallsprinzip einer Gruppe zugeordnet. Natürlich ist das mechanische Verfahren der Hornhautzerteilung ein zusätzlicher iatrogener Stressfaktor für die kornealen Zellschichten, der ebenso einen Einfluss auf die Hornhautqualität haben kann. Durch das Schneiden der Hornhäute kann sich das Endothel, insbesondere im Präparationsbereich ablösen oder auch gequetscht werden und dadurch Zellverluste auftreten. Da jedoch jede Spenderhornhaut präpariert wurde lässt sich der Risikofaktor für einen Endothelzellverlust auf alle Gruppen verteilen. In einigen Studien wurde untersucht, inwieweit es zu einem Verlust der Endothelzellichte durch operative Traumata kommt. Díaz-Valle et al. beschrieben bereits 1998 einen mittleren signifikanten Endothelzellverlust von 11,5 % gegenüber den präoperativen Werten nach Katarakt-chirurgischen Eingriffen (186). Einen Unterschied zwischen den prä- und postoperativen Unterschied in den morphometrischen Indizes zeigte sich hierbei jedoch nicht. Zudem hat man in einigen wenigen prospektiven Studien gesehen, dass eine entscheidende Rolle die Art der chirurgischen Intervention spielt, so zum Beispiel ist nach einer DSAEK gegenüber der pKP ein höherer früher postoperativer Endothelzellverlust zu verzeichnen, ursächlich ist hierbei vor allem das chirurgische Trauma beim Einsetzen des Transplantats (187). In einer Studie von Terry et al. wurde deutlich dargestellt, dass verschiedene chirurgische Faktoren abhängig des Kompressionstraumas einen höheren Endothelzellverlust bedingen (188). Dieses wiederum auch mit dem Geschick und der Erfahrung des Operateurs korreliert. Schlussendlich kann eine Manipulation des Hornhauttransplantats zu einer Schädigung des Endothelzellen führen, das Ausmaß korreliert mit der Größe des Traumas. Insgesamt ist es jedoch schwer, dass durch uns gesetzte chirurgische Trauma bei der Zerteilung der Hornhaut zu quantifizieren. Für die Analyse der EZD wurden deshalb 5 Bereiche außerhalb der Präparationsgrenze herangezogen, um so eine Verfälschung der EZD- Werte zu minimieren.

Bei einem anhaltenden Mangel an verfügbaren Spenderhornhäuten, auch für die wissenschaftliche Nutzung ist der Ruf nach Alternativen groß. Um dem entgegenzuwirken, befassten sich bereits einige Arbeitsgruppen mit der Kultivierung humaner cornealer Endothelzellen (HCEC). Dafür werden Zellpopulationen cornealen Endothels isoliert und *in-vitro* unter kontrollierten Bedingungen kultiviert. 1958 wurde erstmals die Separierung der einzelnen Schichten der Kaninchencornea mit anschließender Kultivierung aller drei Zelltypen

beschrieben. In den letzten 20 Jahren konnten durch moderne Methoden bei der Zellkultivierung enorme Fortschritte bei der Züchtung und Rekonstruktion von Gewebe erzielt werden. Problematisch bleiben jedoch die Isolierung, Langzeitkultivierung sowie die geringe Lebensrate der primär isolierten Zellen (189). Native Endothelzellen haben eine begrenzte natürliche Proliferationsfähigkeit und unterliegen häufig in *Ex-Vivo*-Kultur Phänotypveränderungen. Ebenso sind die korrekte Identifizierung und Isolierung von cornealen Stammzellen aus Spenderhornhäuten und ihre *Ex-vivo* Vermehrung sowie Differenzierung in funktionelle corneale Endothelzellen schwierig (190), (191). Zudem ist aufgrund der geringen Größe der Hornhaut (Durchmesser ca. 12 mm) die für eine *In-vitro*-Kultivierung benötigte und isolierbare Zellzahl gering. Daher ist die Endothelzelltransplantation und Kultivierung noch ein experimentelles Verfahren. Die Transplantation von im Labor generierten Zelltransplantaten aus *in vitro* kultivierten Zellen nimmt an Bedeutung jedoch zu und die Methoden zur Herstellung sind schon weit fortgeschritten, wenn insgesamt noch sehr aufwendig und schwierig. Zudem steht dem Einsatz in der Klinik noch entgegen, dass die momentan experimentell eingesetzten Zellen genetisch manipuliert wurden, um ihre Proliferationsfähigkeit zu erhöhen. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Voraussetzungen für einen möglichen Ersatz von Spenderhornhäuten durch Zellkulturen gegeben sind und in beiden Versuchsanordnungen gleichwertige Resultate erzielt werden würden. Die Cornea unterliegt einen vielschichten Aufbau unter Beteiligung verschiedener Zelltypen mit komplexen Regulationsmechanismen. Daher sehe ich in der Verwendung von Spenderhornhäuten einen großen Vorteil und als einen Vorzug Zugriff auf Spenderhornhäute zu Forschungszwecken zu haben.

5.5 Die Zugabe von RSV in Kulturmedium

In unserem Studienmodell betrug die Endkonzentration von RSV 1 μM in Kulturmedium. Die *Ex-vivo* Anwendung von RSV als Zugabe zu Kulturmedium ist bereits in einer Studie von Marino et al. beschrieben, mit positiven Ergebnissen, die letztendlich von einem Stofftransport über Diffusion (192) ausgehen. In verschiedenen Studien zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von RSV. RSV zeigte bereits in niedrigen Dosen (1 μM bis 10 μM) die gewünschten positiven Effekte bzw. eine antioxidative Wirkung (193) (194). Auch unsere Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Konzentration von 1 μM RSV in Kulturmedium zu einer Reduktion von oxidativem Stress und folglich zu einem verminderten Endothelzellverlust führt. Ob in unserem Studienmodell eine höhere Dosierung von RSV zu einer weiteren Stressreduktion und einer höheren Endothelzelldichte geführt hätte bleibt offen und kann nur durch weitere experimentelle Versuche mit verschiedenen RSV-Konzentrationen beantwortet werden. In der Literatur finden sich jedoch auch Hinweise, dass höhere RSV-Konzentrationen negative

Effekte, bis hin zur Zytotoxizität, auslösen. Martins et al. (2014) zeigten, dass hohe RSV-Konzentrationen ($> 25 \mu\text{M}$) die Produktion von reduziertem Glutathion induziert und in-vitro Zelltoxizität verursacht. Tatsächlich lösten hohe RSV-Konzentrationen einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg von ROS aus, der schließlich bei einer Dosierung ab $50 \mu\text{M}$ RSV zum Zelltod führte (195). Veränderungen des Redoxzustandes und der Anstieg von ROS ist auch ein kritischer Schritt bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen (196). Posadino et al. berichteten, dass RSV dosisabhängig den intrazellulären oxidativen Zustand in vaskulären Endothelzellen erhöhen kann. Niedrige In-Vitro-RSV-Konzentrationen ($0,5 \mu\text{M}$) zeigten antioxidative Wirkungen, höhere In-Vitro-Konzentrationen von RSV ($> 25 \mu\text{M}$) induzieren oxidativen Stress. Dies führte zu einer signifikanten Abnahme der metabolischen Aktivität dieser Endothelzellen und ihrer Überlebensrate (197-199). In dieser Studie wurde eine zu unserer Arbeit vergleichbare RSV-Konzentration ($1 \mu\text{M}$) für die In-vitro-Anwendung auf Endothelzellen gewählt, mit übereinstimmenden Ergebnissen. In unserer Arbeit zeigte sich bei der Anwendung von $1 \mu\text{M}$ RSV ebenfalls keine signifikante Abnahme der EZD zur Kontrollgruppe. Für einen weiteren Vergleich fehlen jedoch aussagekräftige Studien, die sich mit der Anwendung von RSV auf korneale Endothelzellen befassen. Daher sind weitere Studien erforderlich, um die Sicherheit von RSV gegenüber gesunden Endothelzellen zu bestätigen, insbesondere bevor RSV als Antioxidans in Kulturmedium von Spenderhornhäuten standardmäßig zugesetzt wird.

5.6 Verwendung des Kulturmediums M2 über die empfohlene Kultivierungszeit hinaus

Die Methode der Gewebekultivierung ermöglicht die Überprüfung der Gewebektivität, da sie die biologischen Prozesse und Zellfunktionen nicht unterbricht, sondern weiterlaufen können. Das Kultivierungsmedium M2 der Firma Biochrom AG ist aufgrund des Zusatzes von Dextran als Transport- und Entquellungsmedium geeignet. Es verhindert eine zu starke Quellung der Hornhäute, so dass eine Beurteilung der Endothelzellschicht möglich ist. Nach Herstellerangaben sollte M2 Kulturmedium nicht für eine Langzeitkultivierung von Spenderhornhäuten genutzt werden, es wird eine Kultivierungszeit von maximal 6 Tagen empfohlen. In unseren Studienmodell haben wir die Hornhäute über den gesamten Untersuchungszeitraum in M2-Medium kultiviert, um die regelmäßige lichtmikroskopische Evaluierung vornehmen zu können. Denn die Schwierigkeit in dextranfreien Organkulturen ist die erhebliche Quellung des Gewebes, die zu Hornhauttrübungen führt und dadurch die Bestimmung der Hornhautqualität anhand der Endothelzellzahl/ mm^2 erschwert. Der Zusatz von Dextran als hyperosmolare Substanz in Kulturmedium wird kontrovers diskutiert und ist in diversen Studien untersucht worden. In dextranfreien Medium kultivierte Hornhäute zeigten

eine durchschnittliche Abnahme der Endothelzellzahl von 0,7 % pro Tag. Eine Dextran-Supplementation führte zu einem mittleren Endothelzellverlust von 2,01 % pro Tag; dies entspricht einen Anstieg um den Faktor 2,9. Es wurde festgestellt, dass die toxische Wirkung von Dextran zeit- und konzentrationsabhängig ist (200). Bei Lagerungen in Dextran 40 %-haltigem Medium waren toxische Zellveränderungen und erhebliche Endothelzellverluste zu beobachten, sodass nach heutigen Standards eine 6 %ige dextranhaltige Lösung verwendet wird. In einer Studie von Bigar *et al.* (1975) wurden humane Hornhäute für sieben Tage in dextranhaltigem Gewebekulturmedium gelagert und mittels Elektronenmikroskopie regelmäßig evaluiert. Es zeigte sich eine hohe Qualität des Gewebes nach der Lagerung (201). Die Studiengruppe von Van der Want *et al.* (1983) kam zu ähnlichen Ergebnissen, sie beobachteten Hornhäute in einer mehrtägigen Lagerung in Medium mit 8 % Dextran und fanden keine Hinweise auf Zelldegenerationen oder größere Zellverluste (72). In einer weiteren Studie zur Kultivierung von Hornhäuten von Reim *et al.* an der Technischen Hochschule Aachen wurden Schweinehornhäute in 10%igem Dextran-Medium gelagert. Dabei wurde beobachtet, dass bis zum 20. Tag der Lagerung sich das Korneaendothel intakt darstellte und einen funktionierenden Energiestoffwechsel aufwies (202). Demzufolge ist also davon auszugehen, dass dextranhaltiges Kulturmedium durchaus geeignet ist, eine Kornea für bis zu 20 Tage darin zu lagern (202). Da der Metabolismus und die Langzeitwirkungen von Dextran auch heute noch weitgehend unbekannt sind, erfolgt der Zusatz und die Lagerungszeit in dextranhaltigem Medium bisher jedoch zurückhaltend. Anhand der aktuellen Studienlänge kann eine Schädigung der Hornhäute durch die längere Kultivierung in dextranhaltigem Medium nicht sicher ausgeschlossen werden.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt unserer experimentellen Methoden ist die Überschreitung der empfohlenen Lagerungszeit in gleichen Medium. In unserem Studienmodell wurden die Hornhäute in M2-Medium für einen Zeitraum von maximal 28 Tagen gelagert, ein Medienwechsel erfolgte nicht. Somit muss bei dem beobachteten Endothelzellverlust der Faktor Langzeitkultivierung in verbrauchtem Medium berücksichtigt werden. Hinsichtlich des Mediums zeigt sich mit fortschreitender Lagerungszeit eine Abnahme der Glukosekonzentration sowohl im Medium und als auch im Gewebe sowie eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs. Darüber hinaus gibt es einen Anstieg der Laktatkonzentration und einen allmählichen Abfall des pH-Werts von 7,36 auf 6,64 während einer vierwöchigen Kultivierung. Es besteht ein vertikaler Gradient vom pH-Wert und der Laktatkonzentration in dem Lagerungsgefäß der Spenderhornhaut, diese sind vor allem am Boden der Lagerungsfläschchen am größten (203, 204). Kim *et al.* zeigten, dass die kontinuierliche Inkubation von humanen Hornhautepithelzellkulturen ohne Mediumwechsel zu einem langsamen Anstieg der Apoptose führt (205).

Obwohl die genaue Rolle und der Einfluss von oxidativem Stress während der Lagerung von menschlichem Spenderhornhautgewebe durch Studien noch nicht hinreichend beantwortet ist, zielen die Ergebnisse auf eine Empfehlung zum regelmäßigen Mediumwechsel ab. In unserer wissenschaftlichen Arbeit erfolgte die Lagerung kontinuierlich in M2-Medium, sowohl in jeder Versuchsreihe als auch in jeder Versuchsgruppe. Somit besteht dextranhaltiges und verbrauchtes Medium als möglicher negativer Faktor für den im Verlauf aufgetretenen Endothelzellverlust sowohl in der Expositions- als auch in der Kontrollgruppe. Abschließend ist zu sagen, dass die biologische Wirkung eines alternden Gewebekulturmediums unseres Wissens nicht ausreichend untersucht ist. Solche Informationen würden jedoch relevante Einblicke in die Diskussionen über Routine bezüglich der Positionierung von Spenderhornhäuten und des Mediumwechsels während der Lagerung geben.

5.7 Kriterien der Endothelevaluation

Bei der Begutachtung einer geeigneten Spenderhornhaut stellt die Beurteilung des Hornhautendothels ein wichtigstes Kriterium dar und erfolgt computergestützt mikroskopisch. Entscheidend für die Transparenz der HH sind die Zelldichte, die Morphologie und die Vitalität der Endothelzellen. Die mikroskopische Untersuchung des Spendergewebes ist im technischen Ablauf einfach durchzuführen, erfordert aber eine gewisse Erfahrung und ist untersucherabhängig.

5.7.1 Endothelzelldichte

Bei der Beurteilung des Endothelzelllayers wurde in der hiesigen Arbeit vor allem das Kriterium der Endothelzelldichte (Endothelzellen/mm²) berücksichtigt, da es nach der Gewebekultur unter anderem ein sehr entscheidendes Kriterium zur Transplantatfreigabe ist. Um eine Standardisierung und Objektivierung der mikroskopischen Begutachtung der Hornhäute und anschließenden Endothelzellzählung zu realisieren, wurde der gesamte Prozess, von der mikroskopischen Darstellung bis hin zur Zellauszählung am PC vom gleichen Betrachter und zum annähernd selben Zeitpunkt durchgeführt. Aufgrund der Zerteilung der Hornhäute und deren anatomischen Krümmung war es teilweise schwierig den vergrößerten Bereich in der dargestellten Gesamtaufnahme zu fokussieren (siehe Abb. 16) und so zählbar abzubilden, sodass die entsprechende Hornhautaufnahme mikroskopisch einmal komplett angeschaut wurde und anschließend bei insgesamt gleichen Endothelverhältnissen, d.h. ohne flächig nekrotische Anteile der scharf gestellte Bereich für das gesamte Bild berechnet wurde. So muss die ermittelte Endothelzellzahl als relativ angesehen werden. Um dies als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, konzentrierten wir uns in der statistischen Auswertung nicht auf

die absolute Endothelzellzahl der Hornhäute, sondern auf den mittleren prozentualen Verlust der Endothelzellen über die Kultivierungszeit.

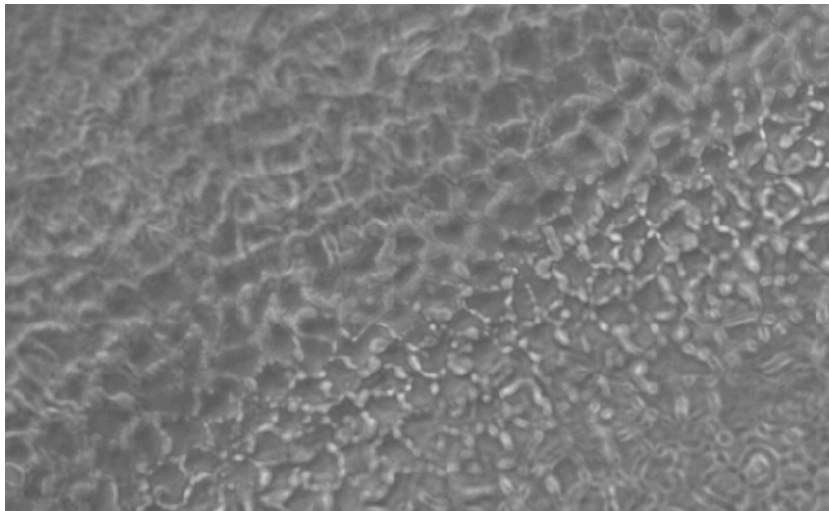


Abbildung 16: Mikroskopische Darstellung des Hornhautendothels. Aufgrund der anatomischen Krümmung kann nur ein Bereich scharf abgebildet werden.

5.7.2 Endothelzellvitalität

In Anlehnung an die Standards in der HHB Mainz wurde in der 2. Versuchsreihe zur Wirksamkeit von RSV als zusätzliches Kriterium die Vitalität der Endothelzellen beurteilt. Die mikroskopische Beurteilung der Vitalität über die Gewebekultur ist eine standardisierte Vorgehensweise bei der Begutachtung einer Spenderhornhaut und erfolgt durch die Mitarbeiter der HHB. Die Gewebekultur ermöglicht die Gewinnung von Spenderhornhäuten mit einer *post mortem*-Zeit bis zu 72 Stunden, in der die Kultivierung oft selbst als Vitalitätstest dient. Zu Beginn der Organkultur als auch vor Transplantation wird eine Endotheluntersuchung durchgeführt, dabei EZD und Nekroserate beurteilt. Dadurch kann ein primäres Transplantatversagen mit einer abnehmenden Zelldichte als auch durch degenerative Zellveränderungen ermittelt werden (206). Etwa 10 % der Endothelzellen sterben während der Gewebekultur ab. Als Ursache wird die mechanische Manipulation bei der Entnahme und der Präparation angenommen. Ebenfalls kann eine zunehmende Nährstoffarmut über die Kultivierungszeit ein Untergang der Endothelzellen begünstigen und zu Stoffwechselveränderungen der Kornea führen (203, 207, 208). So entstandene Endothelzellverluste treten meist disseminiert über die gesamte Endothelzellfläche auf und die entstandenen Lücken können durch benachbarte vitale Endothelzellen geschlossen werden. Nekrotische Endothelzellen lösen sich aus dem Zellverband und schrumpfen, dies führt bei großflächiger Nekrose zu Endothellücken, wo eine denudierte Descementmembran zurückbleibt (209). Durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau lassen sich vereinzelte avitale Zellen besser erkennen, flächige Nekrosen lassen sich jedoch gut mikroskopisch feststellen.

In unserer wissenschaftlichen Arbeit erfolgte die Beurteilung der Endothelvitalität anhand der mikroskopischen Darstellung der Zellmorphologie und intakten Zellgrenzen. Nach Gabe der HH in BSS quellen die Interzellulargrenzen auf und ermöglichen eine einfache Bestimmung dieser. Die Morphologie der Zellgrenzen erfährt nach längerer Kultivierungszeit typische Veränderungen, es findet eine Vergrößerung des Musters statt (siehe Abbildung 16 und 17). Eine gleichmäßige oft sackförmige Konfluenz der quellenden Interzellulargrenzen kann ebenfalls bereits als degeneratives Zeichen gelten (206), sodass die Bestimmung der Endothelzellvitalität als ein wichtiges Beurteilungskriterium mit herangezogen werden sollte, da es eine Aussage über den aktuellen Zustand des Transplantats gibt. Für weitere experimentelle Untersuchungen an Spenderhornhäuten ist gegebenenfalls über eine Vitalfärbung mit Trypanblau sowie eine kontinuierliche Aussage, d.h. über alle Versuchsreihen hinweg, über die Zellvitalität ratsam.

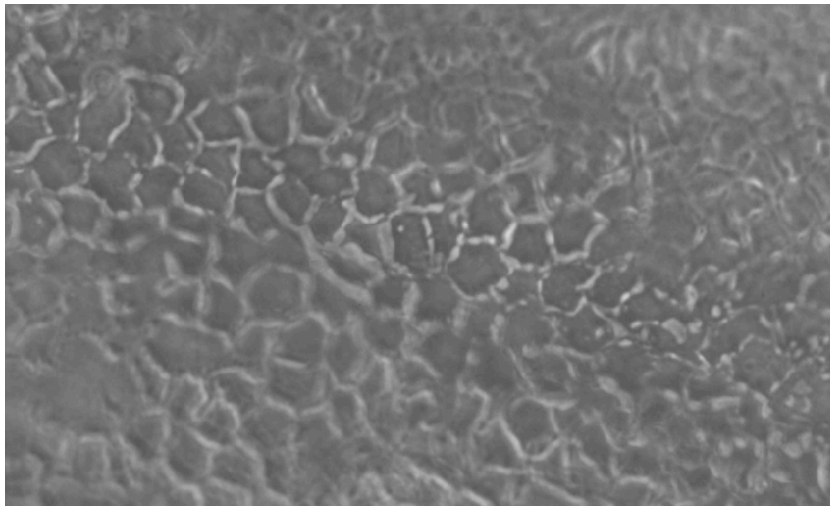


Abbildung 17: 250-fache Vergrößerung. Untersuchung einer kultivierten Spenderhornhaut in M2. Vereinzelt ist eine Konfluenz der sonst regelmäßig segmentierten Interzellularräume sichtbar. Einzelne Zelldefekte sind sichtbar.

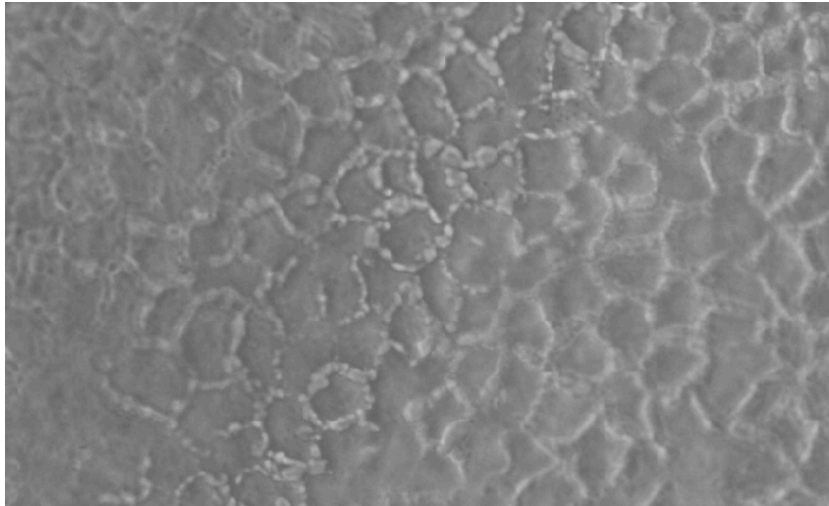


Abbildung 18: 250-fache Vergrößerung. Untersuchung der gleichen Spenderhornhaut in BSS nach weiteren 7 Tagen in Organkultur. Die Interzellularstrukturen sind annähernd gleichmäßig dargestellt, das Muster weist jedoch im Vgl. zur Voraufnahme eine Vergrößerung auf.

5.8 Ausblick und offene Fragen

In Zusammenschau der Ergebnisse stellt RSV als Antioxidans einen potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt gegen oxidativen Stress in kornealen Endothelzellen dar. RSV kann bei Erkrankungen oder Stresszuständen der Hornhaut zellprotektiv wirken. Resveratrol in Kulturmedien hatte bei einer Konzentration von 1 μM keine zytotoxische Wirkung, zeigte jedoch eine signifikante Schutzwirkung gegen Wasserstoffperoxid-induzierte Zytotoxizität und Endothelzellverlust. Die angewendeten Lösungsmittel DMSO, DMSO und RSV als auch PBS führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ebenfalls zu keiner signifikanten Differenz in der kornealen Endothelzellichte der Spenderhornhäute. Somit ist deren Anwendung auch in Kombination mit RSV, als unbedenklich zu werten. Dies gilt jedoch nur für die in unserer wissenschaftlichen Arbeit verwendeten Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen im Umkehrschluss jedoch auch, dass RSV zur Optimierung der Transplantatqualität durch einen positiven Effekt auf die Endothelzellichte im standardisierten Prozess der Hornhautkultivierung in der HHB Mainz nicht beiträgt.

Aufgrund der vielversprechenden antioxidativen Wirkungen wäre zukünftig der Einsatz von RSV als Substanz in Situationen mit einem erhöhten Anfall an oxidativem Stress wie womöglich in einem operativen Setting oder bei cornealen Infektionen denkbar.

Die bisher zahlreich durchgeführten Studien haben Beweise für die verschiedensten biologischen Wirksamkeiten von RSV geliefert, darunter die Reduzierung von oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion, Apoptose, Angiogenese ect. Diese Studien haben als Wirkmechanismus von RSV viele verschiedene molekulare Ziele und Wirkmechanismen vorgeschlagen. Obwohl eine Vielzahl von pharmakologischen Aktivitäten von RSV

dokumentiert wurde, ist die Wirkung von RSV teilweise immer noch unklar und bei den verschiedensten Zelltypen unterschiedlich oder sogar kontrovers diskutiert. Beispielsweise vermittelt RSV in Tumorzellen eine durch Mitochondrien vermittelte Apoptose, während es in unserer Arbeit, die durch oxidativen Stress induzierte Apoptose vermindert. Darüber hinaus sind viele Wirkungen und Mechanismen, die durch Resveratrol reguliert werden sollen, beim Menschen noch nicht bestätigt. Weitere Untersuchungen unter Verwendung klinischer sowie experimenteller Studien und randomisierter Versuchsprotokolle sind erforderlich, um die Wirksamkeit und das volle Potenzial von RSV, so auch beispielsweise in der ophthalmologischen Anwendung, weiter aufzuschlüsseln. Weitere Studien sind notwendig, um unsere Frage nach der Wirkung von RSV auf korneales Endothel befriedigend zu beantworten. Es sollte zusätzlich zur EZD weitere Beurteilungsparameter herangezogen werden und dabei in erster Linie auf molekularer Ebene nach weiteren Markerproteinen und/oder Enzyme gesucht werden, die unsere Annahme, dass RSV antioxidative und antiapoptotische Eigenschaften auf korneales Endothel hat, stützt. Ein Anfang in diese Richtung ist bereits mit der immunfloreszierenden Färbung mit DHE unternommen. Weitere immunhistochemische Färbungen wären denkbar. Bei diesem Verfahren werden definierte Zellstrukturen und Proteine angefärbt, um eine differenzierte Aussage über die durch RSV hervorgerufenen zellulären biomolekularen Effekte zu erhalten und verifizierte Aussagen zur therapeutischen Wirksamkeit zu treffen.

Wie bereits erwähnt birgt die Arbeit mit humanen Spenderhornhäuten das Risiko einer Verzerrung der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Spendervariablen. Eine Alternative dazu wäre die Verwendung von Zellkulturen. In einigen wissenschaftlichen Untersuchungen werden bereits weltweit etablierte und gut charakterisierte Zellpopulation von humanen kornealen Endothelzellen verwendet. Aktuell sehe ich jedoch die Verwendung von Spenderhornhäuten als vorteilhaft an, da der Einsatz von Zellkulturen zum jetzigen Stand der Wissenschaft noch sehr aufwendig und experimentell ist. Ob eine Weiterentwicklung dieser in Zukunft ebenso einen adäquaten Ersatz für humanes Hornhautgewebe darstellt und der Bedarf an Hornhautspenden über Zell- bzw. Gewebekulturmodelle gedeckt werden könnte, (186) bleibt zu hoffen.

Abschließend sei abermals gesagt, dass aufgrund einer alternden Weltbevölkerung die Behandlung von Augenerkrankungen und der Bedarf an Hornhauttransplantationen eine zunehmende medizinische Aufgabe darstellt und deshalb die Suche nach fortschrittlichen und neuen Lösungsansätzen ins Auge gefasst werden sollten.

6 Zusammenfassung

Korneaerkrankungen, die die Indikation zur Hornhauttransplantationen stellen sind in einer alternden Weltbevölkerung ein zunehmendes Gesundheitsproblem und ihre Behandlung ein wichtiges Thema. Leider besteht heute, trotz zunehmender Aufklärung, immer noch eine Diskrepanz zwischen verfügbaren Spenderhornhäuten und den Bedarf. Um den Engpass zu überwinden, kommt der Arbeit der HHB mit der Bereitstellung der Transplantate, Organkultivierung und Qualitätskontrollen eine entscheidende Rolle zu. Insgesamt 30 % der Hornhautspenden werden aufgrund mangelhafter Endothelqualität verworfen. Diese recht hohe Verwerfungsrate bringt Verbesserungspotenzial mit sich und verlangt nach neuen Strategien zur Verringerung dieser. Ein vielversprechender Ansatz hierfür stellte der Einsatz von RSV dar, dem es mit dieser Studie galt darzulegen. In Kultivierung wurden Spenderhornhäute erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt und ein Abfall der Endothelzelldichte induziert. Konzentrationsabhängig kommt es nach Inkubation mit H_2O_2 im Korneaendothel zu einem erheblichen Zellverlust. Bei der Anwendung sehr geringer H_2O_2 -Konzentrationen konnte kein wesentlicher Abfall der Endothelzelldichte verzeichnet werden. Anschließend untersuchten wir die Wirkung von RSV auf die korneale Endothelzelldichte von gestressten Spenderhornhäuten. Die Ergebnisse unserer wissenschaftlichen Arbeit zeigen, dass RSV eine antioxidative Wirkung in kornealen Endothelzellen, die erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind, hat. In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine insgesamt signifikant geringere Abnahme der Endothelzelldichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass RSV als direkter Radikalfänger fungiert und wie in weiteren Studien beschrieben auch antioxidativ-wirkende Enzyme induziert. Sodass RSV durchaus ein vielversprechender Ansatz in der Behandlung kornealer Erkrankungen oder vor einer Hornhautoperation, die einen erhöhten Stresszustand für die Hornhaut bedeuten, darstellt. In der standardisierten Hornhautkultivierung, wie wir sie in der Hornhautbank Mainz vorfinden, konnte durch die Zugabe von RSV keine signifikant positive Wirkung auf die Endothelzellzahl festgestellt werden. Die statistische Auswertung des Wirkungsnachweises von DMSO sowie DMSO in Kombination mit RSV auf korneale Endothelzellen zeigte keine schlüssigen Ergebnisse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, da es in keiner Gruppe zu einem signifikanten Abfall der Endothelzellzahl gekommen ist. Dies lässt aber auch die Annahme zu, dass die verwendeten Substanzen in den verwendeten Konzentrationen keine zytotoxische Wirkung auf das korneale Endothel hat und keine apoptotischen Zellmechanismen induziert. Um unsere Ergebnisse zu verifizieren, sind weitere experimentelle Studien erforderlich, die nach Möglichkeit mit einer größeren Fallzahl durchgeführt werden sollten. Ebenso wurde über die Methoden diskutiert und die limitierenden Faktoren dieser wissenschaftlichen Arbeit aufgezeigt, sodass es einer Optimierung der experimentellen Durchführung sowie weitere

Messparameter bedarf. Beispielweise sollte der Verzicht auf ein Medienwechsel sowie eine Langzeitkultivierung in Entquellungsmedium aufgrund einer ungenügenden Studienlage vermieden werden. Zudem erschwert die wissenschaftliche Arbeit mit humanen Spendergewebe, deren Qualität spenderabhängigen Faktoren (hohes Spenderalter, ophthalmologische Vorerkrankungen, Geschlecht, Todesursache ect. (210, 211) unterliegt, die Vorhersage und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Letztendlich belegen die Ergebnisse unsere Hypothese der antioxidativen Wirksamkeit von Resveratrol auf korneales Endothel. Die Frage nach den genauen Wirkungsmechanismen von RSV bleibt vorerst unbeantwortet und erfordert weitere Studien.

7 Literaturverzeichnis

1. Anselm Kampik FG, A. Bialasiewicz, et al. *Augenärztliche Therapie*: Thieme; 2002 2002.
2. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):214-21.
3. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet*. 2012;379(9827):1749-61.
4. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmology*. 2016;134(2):167-73.
5. Reinshagen H, Maier PC, Böhringer D. [The 2018 Activity Report of the Tissue Transplantation and Biotechnology Section of the German Ophthalmological Society]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2020.
6. 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.
7. Lass JH, Gal RL, Dontchev M, Beck RW, Kollman C, Dunn SP, et al. Donor age and corneal endothelial cell loss 5 years after successful corneal transplantation. *Specular microscopy ancillary study results*. *Ophthalmology*. 2008;115(4):627-32.e8.
8. Sobottka Ventura AC, Engelmann K, Dahinden C, Böhnke M. Endotoxins modulate the autocrine function of organ cultured donor corneas and increase the incidence of endothelial cell death. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(12):1093-8.
9. Larkin DF. Corneal allograft rejection. *Br J Ophthalmol*. 1994;78(8):649-52.
10. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(3):323-33.
11. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.
12. Kaldawy RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea*. 2002;21(2):206-9.
13. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*. 1993;341(8852):1103-4.
14. Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, et al. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res*. 1999;25(2-3):115-20.
15. Sato M, Ray PS, Maulik G, Maulik N, Engelman RM, Bertelli AA, et al. Myocardial protection with red wine extract. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35(2):263-8.
16. Atten MJ, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, Holian O. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drugs*. 2005;23(2):111-9.
17. Pasinetti GM, Wang J, Ho L, Zhao W, Dubner L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(6):1202-8.
18. Vingtdeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*. 2008;9(2):S6.
19. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4390; 1-8.
20. Berke A. *Biologie des Auges*. Mainz. 1999 (2. Auflage)1999.
21. Wittenberg MLUH. *Histopathologische Darstellung der Cornea* [Available from: <http://histohal.unihalle.de/histopatho/index.php?loc=hal&page=day1&system=histo&nav=org>].
22. Lüllmann-Rauch R. *Taschenatlas Histologie (5. Auflage)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, ; 2015. S. 633 ff. p.
23. Aumüller G, Aust, G., Doll, A., et al. *Duale Reihe – Anatomie (2. Auflage)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010. S. 962 ff. p.
24. Grehn F. *Augenheilkunde*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2012.
25. Klauß V, Nasemann J, Sachsenweger M, Ugi I. *Duale Reihe Augenheilkunde*. Stuttgart: Thieme; 2002.

26. Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering—gaining control of collagen organization. *Progress in retinal and eye research*. 2008;27(5):549-77.
27. spektrum.de. Lexikon der Optik - Hornhaut www.spektrum.de [Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/optik/hornhaut/1360>].
28. Jones RF, Maurice DM. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res*. 1966;5(3):208-20.
29. Bourne WM. Clinical estimation of corneal endothelial pump function. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1998;96:229-39; discussion 39-42.
30. Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond)*. 2013;27(5):579-88.
31. Bourne WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol*. 1976;81(3):319-23.
32. Gordon SR. Cytological and immunocytochemical approaches to the study of corneal endothelial wound repair. *Prog Histochem Cytochem*. 1994;28(2):1-64.
33. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res*. 1976;22(6):587-94.
34. Remington LA, Remington L. *Clinical anatomy and physiology of the visual system*. St. Louis, Mo. Elsevier/Butterworth Heinemann; 2012.
35. Hoffer KJ. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. *American journal of ophthalmology*. 1979;87(2):252-3.
36. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1998;105(10):1855-65.
37. Glutathion [Internet]. Thieme Gruppe. 2007 [cited 2007/12/09]. Available from: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-07-01449>.
38. Seitz PD. Deutsches Keratoplastikregister 2019 Universitätsklinikum Saarlando.D. [Available from: <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2010/02/KPL-Register-2019-DOG-Website.pdf>].
39. Cursiefen PDDmC. Hornhauttransplantation. Glänzende Bilanz und viele Perspektiven. *Deutsches Ärzteblatt*. 2005;Jg. 102, Heft 45.
40. Thompson RW, Price MO, Bowers PJ, Price FW. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2003;110(7):1396-402.
41. *Ärzteblatt D. Bekanntmachung Bundesärztekammer. Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank, Erste Fortschreibung*. 24.01.2018.
42. Schaub F, Simons HG, Enders P, Bachmann BO, Roters S, Cursiefen C, et al. [Corneal donation : Dilemma between growing demand and declining donor rate]. *Ophthalmologie*. 2016;113(12):1058-65.
43. Pruß A. Das deutsche Gewebegesetz—Anforderungen und Chancen für Gewebekbanken und klinische Anwender. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2008;35(6):405-6.
44. Heinzelmann S, Böhringer D, Eberwein P, Lapp T, Reinhard T, Maier P. Descemet membrane endothelial keratoplasty for graft failure following penetrating keratoplasty. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017;255(5):979-85.
45. Cursiefen FS, B.O. Bachmann. Update minimalinvasive lamelläre Keratoplastik: DMEK, DSAEK und DALK. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2016. 2015;233.
46. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ, on behalf of all contributors to the Australian Corneal Graft R. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian corneal graft register. *Eye*. 1995;9(2):219-27.
47. Price MO, Thompson RW, Jr., Price FW, Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(8):1087-92.
48. Borderie VM, Boëlle PY, Touzeau O, Allouch C, Boutboul S, Laroche L. Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology*. 2009;116(12):2354-60.
49. Williams KA, Lowe M, Bartlett C, Kelly TL, Coster DJ. Risk factors for human corneal graft failure within the Australian corneal graft registry. *Transplantation*. 2008;86(12):1720-4.
50. Williams KA, Keane MC, Galettis RA, Mills RA, Jones VJ, Coster DJ. *The Australian Corneal Graft Registry: 2018 Report: Australian Corneal Graft Registry*; 2018.

51. Price MO, Thompson RW, Price FW. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Archives of Ophthalmology*. 2003;121(8):1087-92.
52. Witmer R. Das primäre Transplantatversagen. *Spektrum der Augenheilkunde*. 1991;5(2):41-2.
53. Wilhelmus KR, Stulting RD, Sugar J, Khan MM. Primary corneal graft failure. A national reporting system. Medical Advisory Board of the Eye Bank Association of America. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(12):1497-502.
54. Wilson SE, Kaufman HE. Graft failure after penetrating keratoplasty. *Survey of Ophthalmology*. 1990;34(5):325-56.
55. Claerhout I, Beele H, Kestelyn P. Graft failure: I. Endothelial cell loss. *International Ophthalmology*. 2008;28(3):165-73.
56. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):311-9.
57. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea*. 2001;20(6):560-9.
58. Bourne WM. Functional measurements on the enlarged endothelial cells of corneal transplants. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1995;93:65.
59. Nishimura JK, Hodge DO, Bourne WM. Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology*. 1999;106(10):1962-5.
60. Philip Maier TR, Claus Cursiefen. Hauchdünne Hornhauttransplantate - schnelle und gute Sehschärfenerholung. *Deutsches Ärzteblatt*. 2013;Jg 110. Heft 21.
61. Price MO, Gorovoy M, Benetz BA, Price FW, Jr., Menegay HJ, Debanne SM, et al. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the Cornea Donor Study. *Ophthalmology*. 2010;117(3):438-44.
62. van Dijk K, Ham L, Tse WH, Liarakos VS, Quilendrino R, Yeh RY, et al. Near complete visual recovery and refractive stability in modern corneal transplantation: Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cont Lens Anterior Eye*. 2013;36(1):13-21.
63. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Slomovic A, Rootman D. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2008;115(9):1525-33.
64. Brockmann T, Walckling M, Brockmann C, Fuchsluger TA, Pleyer U. Wundheilung der Kornea – Pathophysiologie und Grundlagen. *Der Ophthalmologe*. 2021.
65. Pleyer U, Pohlmann D. Anatomie und Immunologie des Auges. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2017;76(8):656-63.
66. Daniel Böhringer BG, Gabriele Ihorst, Helga Reinshagen, Thomas Reinhard und die FANCY-Studiengruppe. Abstoßungsprophylaxe bei Hornhautübertragung - eine randomisierte Studie zum HLA-Abgleich (FANCY-Studie). *Deutsches Ärzteblatt*. 2018;Jg. 115 Heft 15.
67. Böhringer D, Grotejohann B, Ihorst G, Reinshagen H, Spierings E, Reinhard T. Rejection Prophylaxis in Corneal Transplant. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(15):259-65.
68. Szentmáry N, Goebels S, El-Husseiny M, Langenbacher A, Seitz B. Immunreaktionen nach Femtosekunden- und Excimerlaser-Keratoplastik. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2013;230(05):486-9.
69. Seitz B, Langenbacher A, Kus MM, Küchle M, Naumann GOH. Immunologic graft reactions after nonmechanical corneal trephination using the excimer laser. *Der Ophthalmologe*. 1998;95(9):607-18.
70. Hos D, Matthaei M, Bock F, Maruyama K, Notara M, Clahsen T, et al. Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation. *Progress in retinal and eye research*. 2019;73:100768.
71. Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P, Schroeter J. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(1):143-7.
72. van der Want HJ, Pels E, Schuchard Y, Olesen B, Sperling S. Electron microscopy of cultured human corneas: osmotic hydration and the use of a dextran fraction (dextran T 500) in organ culture. *Archives of Ophthalmology*. 1983;101(12):1920-6.

73. Lin CP, Böhnke M, Draeger J. Effect of dextran on predamaged corneal endothelium: an organ culture study. *Ophthalmic Res.* 1992;24(3):125-8.
74. van der Want HJ, Pels E, Schuchard Y, Olesen B, Sperling S. Electron microscopy of cultured human corneas. Osmotic hydration and the use of a dextran fraction (dextran T 500) in organ culture. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(12):1920-6.
75. Böhnke M, Draeger J, Bornemann D, Steinhorst U. Einfluß der Kulturtechnik auf die Ergebnisse nach Hornhautkonservierung. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde.* 1985;187(08):109-12.
76. Armitage WJ, Easty DL. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(1):16-24.
77. Doughman DJ, Harris JE, Schmitt MK. Penetrating keratoplasty using 37 C organ cultured cornea. *Transactions Section on Ophthalmology American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology.* 1976;81(5):778-93.
78. SPERLING S. Human corneal endothelium in organ culture: the influence of temperature and medium of incubation. *Acta ophthalmologica.* 1979;57(2):269-76.
79. Bohnke M. Corneal preservation in organ-culture. *Current Opinion in Ophthalmology.* 1991;2(4):432-42.
80. Schroeter J, Rieck P, Maier P, Reinhard T. Augenhornhaut-Banken und klinische Anwendung. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2008;35(6):431-7.
81. Reinshagen H, Boehringer D, Seitz B, Reinhard T. [Activities of the tissue transplantation and biotechnology section of the German Ophthalmological Society: 4. Performance report 2013]. *Ophthalmologie.* 2015;112(1):70-2.
82. Reinshagen H, Maier PC, Böhringer D. [The 2017 Report of the Tissue Transplantation and Biotechnology Section of the German Ophthalmological Society]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2019;236(10):1229-32.
83. Schroeter J, Maier P, Bednarz J, Blüthner K, Quenzel M, Pruss A, et al. Arbeitsrichtlinien. *Der Ophthalmologe.* 2009;106:265-76.
84. Böhringer D, Maier P, Sundmacher R, Reinhard T. Costs and financing. A cost calculation of an up-to-date eye bank in Germany. *Dev Ophthalmol.* 2009;43:120-4.
85. Hornhautbank der Universitätsmedizin Mainz Prof. Dr. med Norbert Pfeiffer DrnMA. Jahresbericht 2018 2018 [Available from: http://www.hornhautbank-mainz.de/typo3temp/secure_downloads/9806/0/17ba740418e4dcb25b6b64aa86e58011873b7933/Flyer_Jahresbericht_Hornhautbank_110419_RZ.pdf.
86. Mainz U. Hornhautbank 2021 [Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/hornhautbank/die-hornhautbank/mitgliedschaften.html>.
87. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(3):341-51.
88. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215(2):213-9.
89. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:1-31.
90. Gossiau A, Rensing L. Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie.* 2002;35(2):139-50.
91. Knapp LT, Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *Journal of neuroscience research.* 2002;70(1):1-7.
92. Fiedler H. Reaktive Sauerstoffspezies Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik: Springer Medizin Verlag; [Available from: https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/reaktive-sauerstoffspezies?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_2630.
93. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-48.
94. Al-Kharashi AS. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy. *Saudi J Ophthalmol.* 2018;32(4):318-23.
95. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75.
96. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9).

97. Verlag SM. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht. Empfehlung des RKI. 2008.
98. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):885-8.
99. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA; 2015.
100. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition.* 1996;16(1):33-50.
101. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine.* 1992;119(6):598-620.
102. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5080843.
103. Serbecic N, Ehmann AK, Beutelspacher SC. Verminderung der Lipidperoxidation und der Apoptoserate in kornealen Endothelzellen durch Vitamin A. *Der Ophthalmologe.* 2005;102(6):607-13.
104. Bourne WM, Brubaker RF, O'Fallon WM. Use of Air to Decrease Endothelial Cell Loss During Intraocular Lens Implantation. *Archives of Ophthalmology.* 1979;97(8):1473-5.
105. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Continued Endothelial Cell Loss Ten Years after Lens Implantation. *Ophthalmology.* 1994;101(6):1014-23.
106. Bourne WM, Hodge DO, Nelson LR. Corneal endothelium five years after transplantation. *American journal of ophthalmology.* 1994;118(2):185-96.
107. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1998;105(10):1855-65.
108. Bourne WM. Corneal preservation: past, present, and future. *Refract Corneal Surg.* 1991;7(1):60-1.
109. Bourne WM, Nelson LR, Maguire LJ, Baratz KH, Hodge DO. Comparison of Chen Medium and Optisol-GS for Human Corneal Preservation at 4°C: Results of Transplantation. *Cornea.* 2001;20(7):683-6.
110. Pels E, Schuchard Y. Organ-culture preservation of human corneas. *Documenta ophthalmologica.* 1983;56(1-2):147-53.
111. Komuro A, Hodge DO, Gores GJ, Bourne WM. Cell death during corneal storage at 4 C. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1999;40(12):2827-32.
112. Johnsen-Soriano S, Haug K, Arnal E, Peris-Martinez C, Moe MC, Romero FJ, et al. Oxidative stress gradient in a medium during human corneal organ culture. *Mol Vis.* 2012;18:1604-8.
113. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7761-4.
114. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257-65.
115. Chen Y, Yang Y, Miller ML, Shen D, Shertzer HG, Stringer KF, et al. Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology.* 2007;45(5):1118-28.
116. Berke DA. *Freie Radikale und Hornhaut.* Fachschule für Augenoptik. 2004 2021.
117. Edelhauser HF, Ubels JL. The cornea and the sclera. *Adler's Physiology of the Eye*, 10th ed St Louis, MO: Mosby. 2003;89.
118. Group A-REDSR. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology.* 2001;119(10):1417-36.
119. Serbecic N, Ehmann A, Beutelspacher S. Verminderung der Lipidperoxidation und der Apoptoserate in kornealen Endothelzellen durch Vitamin A. *Der Ophthalmologe.* 2005;102(6):607-13.
120. Tsao YT, Wu WC, Chen KJ, Yeh LK, Hwang YS, Hsueh YJ, et al. Analysis of aqueous humor total antioxidant capacity and its correlation with corneal endothelial health. *Bioengineering & translational medicine.* 2021;6(2):e10199.

121. Pezzuto JM. Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019;27(1):1-14.
122. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1982;30(5):1766-70.
123. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339(8808):1523-6.
124. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*. 2007;101(2):449-57.
125. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React*. 1995;17(1):1-3.
126. Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol*. 1997;53(9):1347-55.
127. Li H, Xia N, Hasselwander S, Daiber A. Resveratrol and Vascular Function. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
128. Kim Y, Zahlten J, Suttorp N, Hocke A, Hippenstiel S, Hübner R. Das Antioxidans Resveratrol vermindert einen durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten oxidativen Stress in Atemwegsepithelien. *Pneumologie*. 2012;66(S 01):P377.
129. Li G, Luna C, Liton PB, Navarro I, Epstein DL, Gonzalez P. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis*. 2007;13:2282-8.
130. Moses RA. The effect of intraocular pressure on resistance to outflow. *Surv Ophthalmol*. 1977;22(2):88-100.
131. Mäepea O, Bill A. Pressures in the juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal in monkeys. *Exp Eye Res*. 1992;54(6):879-83.
132. Luna C, Li G, Liton PB, Qiu J, Epstein DL, Challa P, et al. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(1):198-204.
133. Wang N, Chintala SK, Fini ME, Schuman JS. Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype. *Nat Med*. 2001;7(3):304-9.
134. Zhou Q, Liu YQ, Zhao JL, Zhang H. [Effects of oxidative stress on the expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in porcine trabecular meshwork cells]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2007;29(3):394-7.
135. Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21(5):714-27.
136. Doganay S, Borazan M, Iraz M, Cigremis Y. The effect of resveratrol in experimental cataract model formed by sodium selenite. *Curr Eye Res*. 2006;31(2):147-53.
137. Hightower KR, McCready JP. Effect of selenite on epithelium of cultured rabbit lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(2):406-9.
138. King RE, Kent KD, Bomser JA. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem Biol Interact*. 2005;151(2):143-9.
139. Beli E, Yan Y, Moldovan L, Vieira CP, Gao R, Duan Y, et al. Restructuring of the gut microbiome by intermittent fasting prevents retinopathy and prolongs survival in db/db mice. *Diabetes*. 2018;67(9):1867-79.
140. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012;35(3):556-64.
141. Hammes H-P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*. 2018;61(1):29-38.
142. Kowluru RA, Chan P-S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*. 2007;2007.
143. Wu MY, Yiang GT, Lai TT, Li CJ. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3420187.

144. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol.* 2020;37:101799.
145. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters.* 1997;414(3):552-6.
146. Böhnke M, Draeger J, Bornemann D, Steinhorst U. [Effect of the culture technic on results following corneal preservation]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1985;187(2):109-12.
147. Wikipedia. ImageJ (Version 1.52e, last update: 24.08.2020) [Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/ImageJ#cite_note-5].
148. Pintea A, Rugină D, Pop R, Bunea A, Socaciu C, Diehl HA. Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2011;27(4):315-21.
149. Ceravolo I, Mannino F, Irrera N, Squadrito F, Altavilla D, Ceravolo G, et al. Health Potential of Aloe vera against Oxidative Stress Induced Corneal Damage: An "In Vitro" Study. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(2).
150. Unterweger J. Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in kultivierten Endothelzellen. 2011.
151. Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang G-X, Sun G-P, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2005;16(10):2906-12.
152. Cejková J, Stípek S, Crkovská J, Ardan T, Midelfart A. Reactive oxygen species (ROS)-generating oxidases in the normal rabbit cornea and their involvement in the corneal damage evoked by UVB rays. *Histol Histopathol.* 2001;16(2):523-33.
153. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161(4):488-503.
154. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(3):287-99.
155. Hurst J, Kuehn S, Jashari A, Tsai T, Bartz-Schmidt KU, Schnichels S, et al. A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H₂O₂. *Altern Lab Anim.* 2017;45(1):11-25.
156. Masuda T, Shimazawa M, Hara H. Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9208489.
157. Joyce NC, Zhu CC, Harris DL. Relationship among oxidative stress, DNA damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(5):2116-22.
158. Moyes AL, Holland EJ, Palmon FE, Dvorak JA, Doughman DJ. Tissue utilization at the Minnesota Lions' Eye Bank. *Cornea.* 1995;14(6):571-7.
159. Abu-Amero KK, Kondkar AA, Chalam KV. Resveratrol and ophthalmic diseases. *Nutrients.* 2016;8(4):200.
160. Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Ménétrier F, et al. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *European journal of nutrition.* 2010;49(7):435-46.
161. Lançon A, Frazzi R, Latruffe N. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of resveratrol in ocular diseases. *Molecules.* 2016;21(3):304.
162. Kim YH, Kim YS, Roh GS, Choi WS, Cho GJ. Resveratrol blocks diabetes-induced early vascular lesions and vascular endothelial growth factor induction in mouse retinas. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(1):e31-7.
163. Miura T, Muraoka S, Ikeda N, Watanabe M, Fujimoto Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacology & toxicology.* 2000;86(5):203-8.
164. Jang J-H, Surh Y-J. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2001;496(1-2):181-90.
165. Gülçin İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative food science & emerging technologies.* 2010;11(1):210-8.

166. Gu T, Wang N, Wu T, Ge Q, Chen L. Antioxidative Stress Mechanisms behind Resveratrol: A Multidimensional Analysis. *Journal of Food Quality*. 2021;2021:5571733.
167. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(7):719-31.
168. Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, et al. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Molecular vision*. 2010;16:1467.
169. Berardi V, Ricci F, Castelli M, Galati G, Risuleo G. Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28(1):96.
170. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(1):115-28.
171. In K, Park J, Park H. Resveratrol at high doses acts as an apoptotic inducer in endothelial cells. *Cancer Res Treat*. 2006;38(1):48-53.
172. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*. 2005;16(8):449-66.
173. Jacob SW, Wood DC. Dimethyl sulfoxide (DMSO) toxicology, pharmacology, and clinical experience. *The American Journal of Surgery*. 1967;114(3):414-26.
174. Mueller FO. Die Gefrierkonservierung des Homologen Spendermaterials für Die Durchgreifende Keratoplastik. *Documenta Ophthalmologica*. 1972;31(1):89-140.
175. Del Maestro R, Thaw H, Björk J, Planker M, Arfors K. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*. 1980;492:43-57.
176. Panganamala RV, Sharma HM, Heikkila RE, Geer JC, Cornwell DG. Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*. 1976;11(4):599-607.
177. Liegl O, Erhard I. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Herpes simplex-Virus. *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 1966;169(1):75-84.
178. Sperling S, LARSEN IG. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro. *Acta ophthalmologica*. 1979;57(5):891-8.
179. Fong LP, Hunt CJ, Pegg DE. Cryopreservation of the rabbit cornea: freezing with dimethyl sulphoxide in air or in medium. *Curr Eye Res*. 1987;6(4):569-77.
180. Wusteman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(10):1934-43.
181. Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, Akaydin Y, Dogruer G, Kontas T, et al. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;152(2):186-90.
182. Nagel S, Genius J, Heiland S, Horstmann S, Gardner H, Wagner S. Diphenyleneiodonium and dimethylsulfoxide for treatment of reperfusion injury in cerebral ischemia of the rat. *Brain research*. 2007;1132:210-7.
183. Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011;63(2):209-15.
184. Túnez I, Muñoz MC, Villavicencio MA, Medina FJ, de Prado EP, Espejo I, et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: Protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacological Research*. 2005;52(3):223-8.
185. Man W, Ming D, Fang D, Chao L, Jing C. Dimethyl sulfoxide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in cardiomyocytes via heme oxygenase-1. *J Cell Biochem*. 2014;115(6):1159-65.
186. Díaz-Valle D, Sánchez JMBdC, Castillo A, Sayagués O, Moriche M. Endothelial damage with cataract surgery techniques. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 1998;24(7):951-5.
187. Khor W-B, Mehta JS, Tan DT-H. Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty With a Graft Insertion Device: Surgical Technique and Early Clinical Results. *American Journal of Ophthalmology*. 2011;151(2):223-32.e2.

188. Terry MA, Chen ES, Shamie N, Hoar KL, Friend DJ. Endothelial cell loss after Descemet's stripping endothelial keratoplasty in a large prospective series. *Ophthalmology*. 2008;115(3):488-96.e3.
189. Valtink D-IM, Götze D-CT. Kultivierung transplantierbarer Zellverbände aus cornealem Endothel. 2008.
190. Meir YJ, Chen HC, Chen CC, Ma HD. Revisiting Existing Evidence of Corneal Endothelial Progenitors and Their Potential Therapeutic Applications in Corneal Endothelial Dysfunction. *Adv Ther*. 2020;37(3):1034-48.
191. Smeringaiova I, Utheim TP, Jirsova K. Ex vivo expansion and characterization of human corneal endothelium for transplantation: a review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(1):554.
192. Marino A, Santoro G, Spataro F, Lauriano ER, Pergolizzi S, Cimino F, et al. Resveratrol role in *Staphylococcus aureus* -induced corneal inflammation. *Pathogens and Disease*. 2013;68(2):61-4.
193. Chang YC, Lin CW, Hsieh MC, Wu HJ, Wu WS, Wu WC, et al. High mobility group B1 up-regulates angiogenic and fibrogenic factors in human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *Cell Signal*. 2017;40:248-57.
194. Avotri S, Eatman D, Russell-Randall K. Effects of Resveratrol on Inflammatory Biomarkers in Glaucomatous Human Trabecular Meshwork Cells. *Nutrients*. 2019;11(5):984.
195. Martins LA, Coelho BP, Behr G, Pettenuzzo LF, Souza IC, Moreira JC, et al. Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochem Biophys*. 2014;68(2):247-57.
196. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-4.
197. Posadino AM, Cossu A, Giordo R, Zinellu A, Sotgia S, Vardeu A, et al. Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. *Food Chem Toxicol*. 2015;78:10-6.
198. Giordo R, Cossu A, Pasciu V, Hoa PT, Posadino AM, Pintus G. Different redox response elicited by naturally occurring antioxidants in human endothelial cells. *Open Biochem J*. 2013;7:44-53.
199. Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D, et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
200. Filev F, Oezcan C, Feuerstacke J, Linke SJ, Wulff B, Hellwinkel OJ. Semi-quantitative assessments of dextran toxicity on corneal endothelium: conceptual design of a predictive algorithm. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(1):91-8.
201. Bigar F, Kaufman HE, McCarey BE, Binder PS. Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in man. *Am J Ophthalmol*. 1975;79(1):115-20.
202. 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(02):76-80.
203. Redbrake C, Salla S, Frantz A, Reim M. Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 1999;77(3):266-72.
204. Hjortdal JO, Ehlers N, Andersen CU. Some metabolic changes during human corneal organ culture. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1989;67(3):295-300.
205. Kim JM, Stapleton F, Willcox MD. Induction of apoptosis in human corneal epithelial cells in vitro. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1999;27(3-4):214-7.
206. Böhnke M. Spendergewebe für die Keratoplastik-Erfahrungsbericht aus der Hamburger Hornhautbank. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 1991;198(06):562-71.
207. Salla S, Redbrake C, Becker J, Reim M. Remarks on the vitality of the human cornea after organ culture. *Cornea*. 1995;14(5):502-8.
208. Redbrake C, Salla S, Frantz A. Changes in human donor corneas preserved for longer than 4 weeks. *Cornea*. 1998;17(1):62-5.
209. Singh G, Böhnke M, von-Domarus D, Draeger J, Lindstrom RL, Doughman DJ. Vital staining of corneal endothelium. *Cornea*. 1985;4(2):80-91.
210. Kramp K, Suffo S, Laun D, Bischoff-Jung M, Huber M, Langenbacher A, et al. Analyse von Einflussfaktoren auf die Eignung von kornealem Spendergewebe in der LIONS

Hornhautbank Saar-Lor-Lux, Trier/Westpfalz von 2006 bis 2016. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde. 2020;237(11):1334-42.

211. Uphoff J, Bednarz J, Engelmann K. Verlauf der Endothelzellichte nach perforierender Keratoplastik Einfluss von spender-und empfängerabhängigen Faktoren. Der Ophthalmologe. 2001;98(6):550-4.

8 Anhang

Pos.	Rohstoff	Menge	Waage	Wg.Re	Beh.
01	100015	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,264920000	g	01
02	686511	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200000000	g	01
03	171458	KCl	0,400000000	g	02
04	384464	NaCl	6,800000000	g	02
05	751623	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,140000000	g	02
06	100041	D-GLUCOSE	1,000000000	g	03
07	705715	L-ARGININ.HCl	0,126000000	g	04
08	300011	L-GLUTAMIN	0,292300000	g	04
09	300015	L-HISTIDIN.HCl.H ₂ O	0,042000000	g	04
10	300017	L-ISOLEUCIN	0,052000000	g	04
11	300018	L-LEUCIN	0,052000000	g	04
12	300020	L-LYSIN.HCl	0,073000000	g	04
13	300021	L-METHIONIN	0,015000000	g	04
14	300022	L-PHENYLALANIN	0,032000000	g	04
15	300025	L-THREONIN	0,048000000	g	04
16	300026	L-TRYPTOPHAN	0,010000000	g	04
17	300028	L-VALIN	0,046000000	g	04
18	477493	CHOLINCHLORID	0,001000000	g	05
19	200014	I-INOSIT	0,002000000	g	05
20	200016	NICOTINAMID	0,001000000	g	05
21	286606	D-Ca-PANTOTHENAT	0,001000000	g	05
22	200018	PYRIDOXAL.HCl	0,001000000	g	05
23	200026	THIAMIN.HCl	0,001000000	g	05
24	100040	PHENOLROT-Na	0,010600000	g	06
25	300010	L-CYSTIN	0,024000000	g	07
26	300027	L-TYROSIN	0,036000000	g	07
27	100050	HEPES	2,978750000	g	08
28	100113	AMPHOTERICIN B (Gehalt=100% berück.)	0,002500000	g	09
29	300046	Penicillin-G-Na	0,059880240	g	09
30	300047	STREPTOMYCINSULFAT	0,130548303	g	09
31	100014	NaHCO ₃	2,197500000	g	10
32	200012	FOLSÄURE	0,001000000	g	11
33	200025	RIBOFLAVIN	0,000050000	g	11

			15,041048543	g	
			=====		

Abbildung 19: Rezeptur Kulturmedium I, Biochrom AG

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Ich danke meinem Doktorvater für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und enormen Unterstützung, ohne diese die Fertigstellung der Dissertation nicht in diesem Maße möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutti, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichte und der ich diese Arbeit widme

