

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

**Die Entwicklung von Endothelzellichte der Hornhaut ex vivo und ihre Abhängigkeit
von spenderspezifischen und präoperativen Kriterien**

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

Vorgelegt von
Michael Paulus Jaqoub
aus Bagdad

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. Philipp Drees

1. Gutachter:

PD Dr. med. Joanna Wasielica-Poslednik

2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. Peter Grimminger

Tag der Promotion:

09 Juli 2025

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
2. THEORETISCHER HINTERGRUND	5
2.1 Anatomie der Hornhaut	5
2.2 Zellzyklus des Hornhautendothels	7
3. FORSCHUNGSZIEL	9
4. MATERIAL UND METHODEN	10
4.1 Materialgewinnung und Datenverarbeitung	10
4.2 Anforderungen an Hornhauttransplantate	12
4.2.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studie	12
4.2.2 Entnahme und Kultivierung	14
4.3 Statistik	17
5. ERGEBNISSE	19
5.1 Deskriptive Ergebnisse	19
5.1.1 Spendereigenschaften	19
5.1.2 Präoperative Eigenschaften	21
5.1.3 Zielgrößen	22
5.2 Analytische Ergebnisse	27
5.2.1. Univariable Analyse:	27
5.2.2 Multivariable Analyse	30
6. DISKUSSION	40
6.1 Spendereigenschaften	41
6.1.1 Geschlecht	41
6.1.2 Spenderalter	43
6.1.3 Linsenstatus	47
6.1.4 Todesursache Malignom/Sepsis	48
6.2 Präoperative Eigenschaften	52
6.2.1 Death-To-Explantation-Interval (DEI)	52
6.2.2 Kulturdauer	55
6.3 Initiale Endothelzelldichte (ECD1)	58
6.4 Änderung der Endothelzelldichte	62

Inhaltsverzeichnis

7. ZUSAMMENFASSUNG	68
LITERATURVERZEICHNIS	70
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	74
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	75
TABELLENVERZEICHNIS.....	76
DANKSAGUNG	77

1. Einleitung

Hornhauterkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Ursachen von Blindheit dar. Hornhauttransplantationen ermöglichen in vielen Fällen eine visuelle Rehabilitation und damit einen deutlichen Anstieg der Lebensqualität der Betroffenen. Die Hornhauttransplantation gilt neben der Bluttransfusion als eine der am häufigsten durchgeführten Gewebeübertragungen am Menschen. Die perforierende Keratoplastik wurde zum ersten Mal erfolgreich durch Prof. Zirm im Jahr 1905 durchgeführt. Inzwischen werden neben der perforierenden Keratoplastik eine Reihe von lamellären Verfahren (Schichttransplantationen) angeboten. Insbesondere die Einführung der Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik (DMEK) im Jahr 2006 hat innerhalb einer Dekade zur Verdopplung der Gesamtzahl der Keratoplastiken in Deutschland geführt (1). Im Jahr 2023 wurden in Deutschland 9729 Hornhäute transplantiert – mehr als alle anderen Transplantationen parenchymatöser Organe zusammen (2). Eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Hornhauttransplantation ist eine ausreichende Endothelzelldichte, abgekürzt als ECD von mindestens 2000 Zellen/mm² (3). Das Hornhautendothel stellt die innerste Schicht der Hornhaut dar und ist für die Dehydrierung der Hornhaut und damit für die Transparenz des Gewebes verantwortlich (4). Eine zu niedrige ECD ist der häufigste Grund für die Verwerfung eines Spendergewebes.

Die rasante Entwicklung der Hornhautchirurgie resultiert im konstant ansteigenden Bedarf an Spendergewebe. Weltweit stellt der Mangel an geeignetem Spendergewebe ein Problem dar – auch in Deutschland ist die Spendenbereitschaft gering (5). Die Organisation von Hornhautbanken ist mit hohen Material- und Personalkosten verbunden. Es sollte alles dafür getan werden, den Verlust von entnommenem Gewebe zu verringern. Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von Faktoren, die sowohl eine positive als auch eine negative Entwicklung der Endothelzellen zwischen der Hornhautentnahme und der Transplantation beeinflussen. Ein weiteres Ziel besteht darin, zu untersuchen, ob bestimmte Transplantate bei der Kultivierung in der Hornhautbank anhand ihrer Eigenschaften anders behandelt werden müssen als andere Transplantate. Hierfür widmet sich das zweite Kapitel der Darstellung des theoretischen Hintergrunds zu diesem Thema. Im Anschluss daran werden im dritten Kapitel das Forschungsziel und die Hauptfragestellung dieser Studie dargestellt. Darauf aufbauend werden im vierten Kapitel die Materialbeschaffung und die Datenerhebung beschrieben. Im fünften Kapitel werden die erhobenen Daten deskriptiv dargestellt und mittels bestimmter Tests und Modelle analysiert. Anschließend werden im sechsten Kapitel die Ergebnisse diskutiert und mit anderen wissenschaftlichen Studien verglichen, bevor in dem siebten und letzten Kapitel, alle wichtigen Erkenntnisse zusammengefasst werden. Ein kurzer Ausblick auf weitere aufschlussreiche Forschungsfragen soll diese Arbeit beschließen.

2. Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel werden die anatomischen Merkmale der Hornhaut, ihre Funktion und ihr Zellzyklus beschrieben.

2.1 Anatomie der Hornhaut

Die Hornhaut ist ein transparentes, gewölbtes Gewebe der vorderen äußeren Augenhaut (4,6,7) mit Durchmesser von etwa 11 mm (4,6,8,9).

Die Hornhautdicke beträgt im Zentrum ca. 0,55 mm und am Rand ca. 0,70 mm (4,8). Die Wölbung der Hornhaut erzeugt eine Brechkraft von durchschnittlich +43 dpt, die neben der Augenlinse (Brechkraft circa +21 dpt) den Hauptanteil der Brechkraft des optischen Apparates des Auges darstellt (6,8,10). Die Hornhaut besteht aus fünf Schichten, die jeweils über besondere Funktionen verfügen: das Epithel, die Bowman-Membran, das Stroma, die Descemet-Membran und das Endothel. In sind diese Schichten dargestellt.

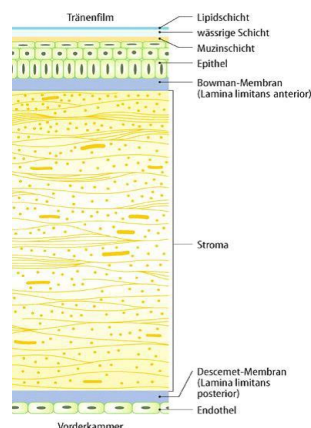


Abbildung 1: Anatomie der Hornhaut, Grehn, Physiologie und Pathophysiologie des Auges 2019 (4).

Die Studie befasst sich mit der letzten Schicht der Hornhaut, dem Endothel, und seiner Funktion. Außerdem wird die Bedeutung einer hohen Endothelzelldichte in Hornhauttransplantaten für die Hornhauttransparenz untersucht.

Endothel

Das Endothel ist die innerste Schicht der Hornhaut. Es befindet sich zwischen der Vorderkammer und der Descemet-Membran. Die Descemet-Membran wird daher als Basalmembran des Endothels bezeichnet. Das Endothel besteht aus einer Monoschicht von Endothelzellen (4,6,11,12). Bei der Geburt eines Menschen beträgt die ECD in der Regel ca. 3000–4000 Zellen/mm². Im Laufe des Lebens nimmt sie konstant ab, wobei diese Abnahme ab einem Lebensalter von ca. 35 Jahren langsamer abläuft (13). Unter der Abnahme verändert sich die Morphologie der Endothelzellen. Unter anderem nimmt durch die Apoptose der Polymegatismus der Endothelzellen zu.

Die Verteilung von Nährstoffen in der Hornhaut erfolgt durch den osmotischen Druck zwischen der Augenvorderkammer und dem kornealen Stroma (4,6,8,11). Kommt es zu einem vermehrten Eindringen des Kammerwassers in die Hornhaut, z. B. infolge der Insuffizienz der Endothelzellen, führt dies zu einem Hornhautödem und zum Verlust der Transparenz (4,8,14). Die Transparenz der Hornhaut und ihre Versorgung mit Nährstoffen sind durch verschiedene Regulationssysteme gewährleistet. Durch die hohe Konzentration von Enzymen wie der Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) sowie der Alpha-Carboanhydrase kommt es unter ATP-Verbrauch einerseits zur Freisetzung von Natrium, das osmotisch das Kammerwasser in die Vorderkammer zieht. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Carboanhydrase zu beobachten, die durch die Bildung von Bikarbonat ebenfalls passiv den Abtransport von Wasser aus dem Stroma bewirkt (4,6,8,11,14). Außerdem wird ein übermäßiges Eindringen vom Kammerwasser in das korneale Stroma durch Zellkontakte zwischen den Endothelzellen (Tight Junctions und Gap Junctions) verhindert (4,6,11,15). Bei einer ECD unter ca. 800 Zellen/mm² kann es zur Quellung der Hornhaut und zur Abnahme der Transparenz kommen (4,6,7,14).

2.2 Zellzyklus des Hornhautendothels

Die Endothelzellen können in vivo nicht oder nur in einem Maße proliferieren, das den Zellverlust bzw. die Abnahme der ECD mit zunehmendem Alter nicht ausreichend kompensieren kann. Das Fehlen einer robusten proliferativen Reaktion auf den Zellverlust macht das Endothel zu einem fragilen Gewebe. Die folgende Abbildung, Abbildung 2 (16) zeigt die positive und negative Regulation des Zellzyklus der Endothelzellen.

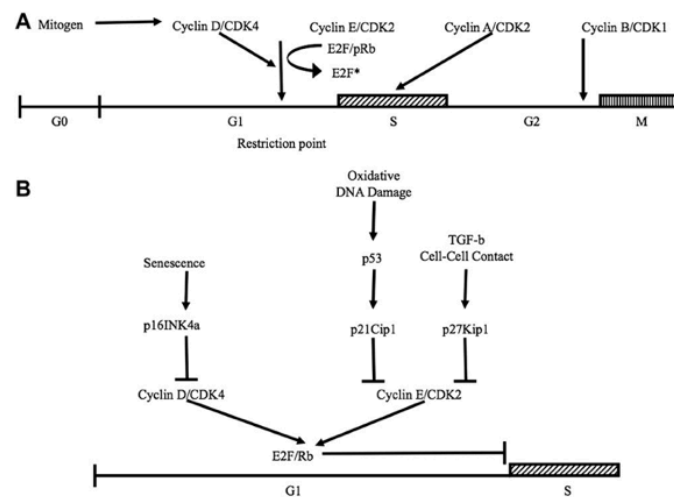


Abbildung 2: A: Positive und B: Negative Regulation der Proliferation des Zellzyklus, Joyce et al. 2012 (16) CDK: Cyclin Dependent Kinase, TGF: Transforming Growth Factor, E2F: Transcription factor in Eukaryotes, TGF- β , RB: retinoblastoma Tumorsuppressor, p53: Tumor Protein 53, Cell Cycle Periods (G0: Rest-Phase, G1: Growth-Phase, S: Synthesis-Phase, G2: Replication-Phase, M: Mitosis-Phase).

Der Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen. In der G0-Phase (Ruhephase) befinden sich die Zellen im Ruhestand, wobei die DNA in Form eines diploiden Chromosomensatzes (2N) vorliegt. Der Eintritt in die G1-Phase (Wachstumsphase) wird durch den Transkriptionsfaktor E2F reguliert. Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors hängt vom Retinoblastom-Protein (pRB) ab.

Wenn pRB in seiner phosphorylierten Form vorliegt, hemmt es den E2F und blockiert damit den Eintritt in die G1-Phase. Diese Phosphorylierung bzw. Aktivierung von pRB wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) vermittelt, deren Aktivität jedoch durch Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) wie p27Kip1, p21Cip1 und p16INK4a gehemmt wird. Mitogene Stimulation führt jedoch zu einer reduzierten Bildung solcher CKIs, wobei diese verstärkt über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden (16). Die hemmenden CKIs, die E2F in der G1-Phase regulieren, werden in zwei Familien unterteilt: die INK4-Familie (z. B. p16INK4a) und die Cip/Kip-Familie (z. B. p21Cip1 und p27Kip1).

Um die Fähigkeit der Endothelzellen zur Proliferation zu untersuchen, wurden in der Studie von Joyce et al. (16) die Farbintensität und die subzelluläre Lokalisation einer Reihe von Schlüsselproteinen des Zellzyklus in transversalen Hornhautschnitten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Insgesamt deuten die Ergebnisse stark darauf hin, dass Endothelzellen im Gegensatz zu anderen Zelltypen des menschlichen Körpers in vivo in der G1-Phase „gefangen“ sind. In der Studie von Joyce et al. 2012 wurden mehrere Mechanismen identifiziert, die zur Aufrechterhaltung der G1-Phase in Endothelzellen in vivo beitragen: Zellkontakthemmung, Mangel an wirksamer Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Unterdrückung des Eintritts der Endothelzellen in die S-Phase durch TGF- β 2. Darüber hinaus konnte der negative Effekt von oxidativem Stress, der stark mit dem Spenderalter assoziiert ist, auf die Fähigkeit der Endothelzellen nachgewiesen werden, und es konnten spezifische Nachteile der Endothelzellen festgestellt werden, wie z. B. ein spezifischer Mangel an Wachstumsfaktoren im Kammerwasser und die Bindung von Wachstumsfaktoren an die Descemet-Membran (17). Auf der Grundlage dieser nachgewiesenen Fakten und der von dieser Studie berücksichtigten Einflussfaktoren auf die Endothelzellichte konnte die Hornhauttransplantation in der folgenden Abbildung 3 zusammengefasst werden.

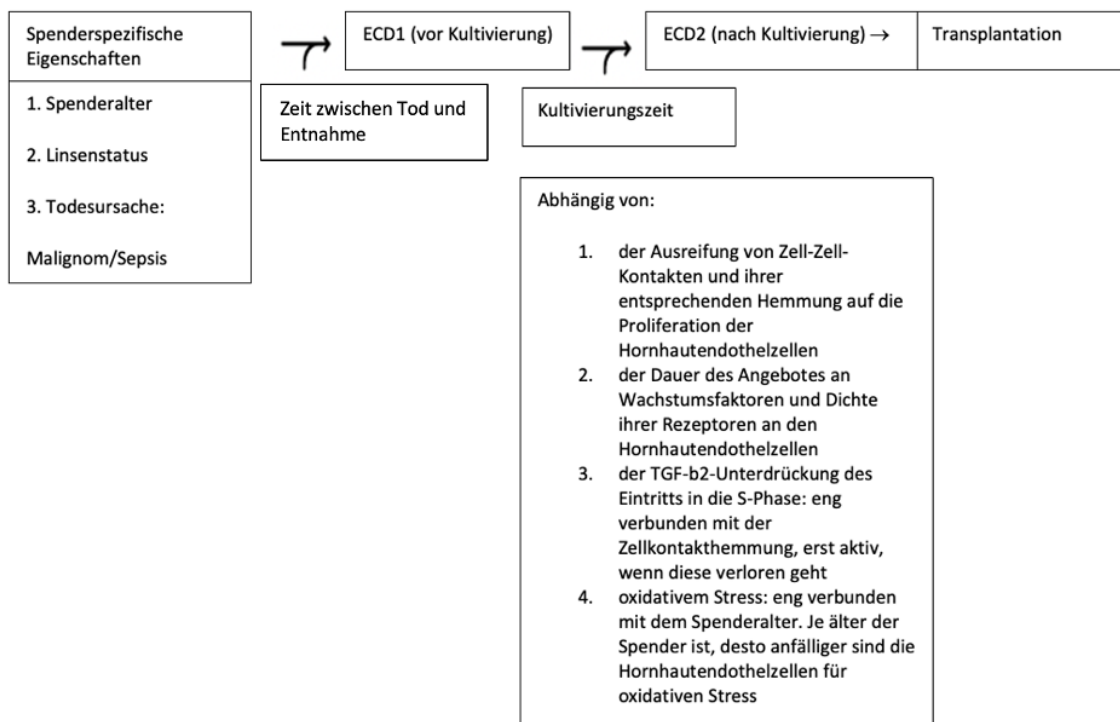


Abbildung 3: Ablauf der Hornhauttransplantation unter Berücksichtigung der Spender- und präoperativen Faktoren sowie der zellulären Einflussfaktoren während der Kultivierung.

Wie die beeinflussbaren Einflussfaktoren am besten reguliert werden können, um bessere Transplantate mit hoher Endothelzellichte zu erhalten, ist einer der Hauptfragen der Studie.

3. Forschungsziel

Dieses Kapitel befasste sich mit dem Forschungsziel dieser Studie. Das Hornhautendothel weist in vivo keine Regenerationsfähigkeit auf (18). Die Frage, ob Hornhautendothelzellen ex vivo proliferieren können, ist für die tägliche Arbeit der Hornhautbanken von großem Interesse. Einige Spenderhornhäute erfüllen unmittelbar nach der Entnahme die Anforderungen an eine optische Hornhaut mit einem ECD von mindestens 2000 Zellen/mm² für die Transplantation. In der mehrtägigen Zellkultur einer Hornhautbank verlieren sie jedoch an ECD und sind daher nicht mehr für eine Transplantation geeignet. Bei anderen Hornhauttransplantaten hingegen kann das Gegenteil beobachtet werden – eine Zunahme der ECD. Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, zu untersuchen, unter dem Einfluss welcher Spender- und präoperativen Eigenschaften Hornhauttransplantate eine ausreichende Endothelzellendichte von ≥ 2000 Zellen/mm² und damit die besten optischen Eigenschaften aufweisen, und welche Faktoren die positive oder negative Entwicklung der ECD während der Kultivierungsphase beeinflussen. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse genutzt werden, um ein strukturiertes Management und einen zielorientierten Umgang mit dem Spendergewebe in der Hornhautbank zu optimieren, um den Verlust der Endothelzellen bei entnommenen Transplantaten zu minimieren.

4. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird erläutert, wie diese Arbeit von der Materialgewinnung über die Datenerhebung bis hin zu den verwendeten Statistiken der erhobenen Daten organisiert ist.

4.1 Materialgewinnung und Datenverarbeitung

In dieser retrospektiven Studie wurden folgende Spender- und präoperative Eigenschaften aus dem Datensatz der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz aufgenommen. Zu den Spendermerkmalen gehören das Geschlecht des Spenders (männlich/weiblich), das Alter des Spenders (in Jahren), der Linsenstatus des Spenders (phak - eigene Linse vorhanden; pseudophak - Kunstlinse vorhanden; aphak - keine Linse) und die Todesursache: Malignom, Sepsis. Malignom und Sepsis bei einem gleichen Spender/Transplantat werden weiterhin als getrennte Eigenschaften betrachtet.

Zu den präoperativen Eigenschaften gehört die Zeit zwischen Tod und Entnahme, die als DEI bezeichnet und in Stunden (h) angegeben wird. Die DEI beschreibt den Zeitraum zwischen Herzkreislaufstillstand und Entnahme des Gewebes. Sie darf in Deutschland für Organkulturen von Augenhornhäuten 72 Stunden nicht überschreiten. Das zweite präoperative Merkmal ist die Kulturdauer in Tagen. Sie beschreibt die Zeit, die die Transplantate nach der Entnahme bis zur Transplantation im Kulturmedium verbleiben.

Die Erfassung von Patientendaten sowie die Auswertung der Ergebnisse und die Erzeugung von Grafiken in dieser Arbeit erfolgten durch Word und Excel 2023 Microsoft Office, USA, SPSS Statistics 27.0 IBM, New York, USA sowie das Statistikpaket SAS 9.4.

Zudem wurde die ECD der Spenderhornhaut in Zellen/mm² als Zielmessgröße in die Auswertung einbezogen. Die Spender mit Aphakie wurden aufgrund ihrer geringeren Anzahl nicht berücksichtigt.

Die ECD den untersuchten Hornhäuten wurde jeweils in der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz durch die Mitarbeiter der Hornhautbank zu folgenden Untersuchungszeitpunkten bestimmt: nach der Entnahme als Ausgangswert (ECD1) und kurz vor der Transplantation als endgültiger Wert (ECD2). In einigen Fällen wurde die ECD in der Zwischenzeit erneut gemessen. Da diese Messung nicht bei allen Hornhäuten durchgeführt wurde, wurden bei der Auswertung der Untersuchung nur die erste und die letzte Messung berücksichtigt.

Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Spender- und präoperativen Eigenschaften einen Einfluss auf die ECD1 und ECD2 haben. Dies erfolgte zum einen durch eine univariable Analyse und zum anderen durch eine multivariable Analyse. Weiterhin wurde die Entwicklung von der ECD1 zur ECD2 in der Kultivierungsphase untersucht. Hierbei wurden zum einen die Effekte von Spender- und präoperativen Eigenschaften als Einflussfaktoren, zum anderem nur die ECD1 und die Kulturdauer berücksichtigt. Bezüglich des Zusammenhangs zwischen jeweils ECD1 bzw. ECD2 und den kategorialen Eigenschaften wie Geschlecht, Linsenstatus und Todesursache (Malignom/Sepsis) wurde mittels t-Test eine univariable Analyse durchgeführt. Bei den kontinuierlichen Variablen wie Spenderalter und DEI wurden die Korrelation nach Pearson sowie die lineare Regression verwendet.

ECD1 und ECD2 wurden deskriptiv jeweils nominal in zwei Gruppen eingeteilt: optische Transplantate (≥ 2000 Zellen/mm²) und nicht-optische Transplantate (< 2000 Zellen/mm²). Zudem wurde in Kapitel (5.1.3 Zielgrößen) in tabellarischer Form dargestellt, wie sich die Verteilung von Spender- und präoperativen Eigenschaften auf die beiden Gruppen aufgeteilt ist. Darüber hinaus wurden die Unterschiede der Mittelwerte kontinuierlicher Variablen wie Spenderalter, DEI sowie Kulturdauer (bei ECD2) zwischen den Gruppen analysiert.

4.2 Anforderungen an Hornhauttransplantate

Bevor es zu einer Hornhautspende kommen kann, müssen potenzielle Spender von den Mitarbeitern einer Hornhautbank auf Ein- und Ausschlusskriterien (Kontraindikationen) überprüft werden. Anschließend werden die Angehörigen der Verstorbenen kontaktiert und aufgeklärt, bevor um ihre Zustimmung oder Ablehnung zur Gewebespende gebeten wird. Die Entscheidung wird entsprechend dokumentiert. Ausschlusskriterien für eine Hornhautspende sind in § 16b Transplantationsgesetz festgelegt (19). Das Gesetz garantiert einheitliche Anforderungen an jede Hornhautbank zum Durchführen einer Hornhautentnahme – in Bezug auf das Erheben anamnestischer Daten des Spenders und in Bezug auf die Dokumentation sowie fachgerechte Konservierung und Kultivierung von Hornhauttransplantaten, bis hin zur Transplantation.

4.2.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studie

In der Studie wurden alle konsekutiven Hornhäute mit einer ECD1 ≥ 1500 Zellen/mm² eingeschlossen. Hornhäute mit ECD1 oder ECD2 von 1500–2000 Zellen/m² wurden als nicht-optische Transplantate, Hornhäute mit ECD1 oder ECD2 ≥ 2000 Zellen/mm² dagegen wurden als optische Transplantate klassifiziert.

Die Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie als Studie aus der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz entsprechen den Ausschlusskriterien der genannten Hornhautbank. – siehe folgende Tabelle 1, in der sie zusammengefasst wurden.

Postmortale Zeit > 72 h (Organkultur), > 16 h (hypotherme Lagerung)
Zentralnervöse Erkrankungen unklarer Genese, wie z. B. Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, Retrovirale ZNS-Erkrankung und Morbus Parkinson
Risiko der Krankheitsübertragung durch Prionen (z. B. Creutzfeldt-Jakob)
Aktive systemische Infektionen (bakterielle Sepsis stellt keine absolute Kontraindikation dar, da die Hornhäute in Organkultur gelagert werden, was die Feststellung einer bakteriellen Kontamination ermöglicht)
Spender mit Nachweis einer der folgenden Infektionen: HIV, Hepatitis C, HTLV I/II Protozoosen: Babesiose, Trypanosomiasis (z. B. Chagas-Krankheit), Leishmaniose

Material und Methoden

Syphilis und andere chronisch persistierende bakterielle Infektionen
Spender mit Hinweisen auf eine der folgenden Erkrankungen: Für 2 Jahre nach Infektion mit Salmonella typhi/paratyphi Für 2 Jahre nach Heilung von Q-Fieber, Tuberkulose, Leptospirosen Für 4 Jahre nach dokumentierter Heilung von Malaria Für 4 Wochen nach Abklingen der Symptome von Masern, Röteln, Varicella Zoster, Hepatitis und anderer als der oben erwähnten Infektionskrankheiten, virale Meningitis, virale Enzephalitis, virales hämorrhagisches Fieber
Corneale/lokale Infektion durch: Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze
Maligne Tumoren des Augenhintergrunds, Retinoblastom
Hämatologische Neoplasien
Hohes Infektionsrisiko (z.B. aufgrund Exposition, Reiseanamnese)
Exposition gegenüber Zyanid, Blei, Quecksilber, Gold
Kürzlich erfolgte Impfung mit einem Lebendimpfstoff mit potenziellem Übertragungsrisiko (z. B. Tollwut)
Empfänger von Heterotransplantaten und Xenotransplantaten
Relative Kontraindikationen: Unbekannte Todesursache Hinweise auf ungünstige Bluttestergebnisse durch Hämodilution (Massentransfusion) Refraktive operative Verfahren (z. B. LASIK, PRK)

Tabelle 1: Ausschlusskriterien für die Hornhautspende in der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz. Die Tabelle stammt aus Schön et al. 2021 (20) und ist angelehnt an die Richtlinien zur Gewinnung von Spenderhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank 2018 (19).

4.2.2 Entnahme und Kultivierung

Hornhautentnahme

Die Hornhäute werden entnommen in acht mit der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz kooperierenden Krankenhäusern. Die Leichen werden mit geschlossenen Augen bei einer stabilen Temperatur von 4°C gelagert. Es werden keine künstlichen Tränen oder Salben verwendet, um sie feucht zu halten. Die In-situ-Exzision eines skleralen Hornhautknopfes ist heutzutage die Standardtechnik in der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz, während die E nukleation nur in wenigen Ausnahmefällen angewendet wird. Nach der Applikation von 5 ml 7,5%igem Jod (Braunol®, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) in die Fornices dient der Überschuss zur großzügigen Desinfektion des Augenmilieus. Nach 5 Minuten Einwirkzeit und Spülung mit 0,9%iger NaCl-Lösung werden 0,5 mg/ml Gentamicin-Augentropfen (Gentamicin-POS®, Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) auf beide Fornices aufgetragen. Nach Abdecken des Gesichts mit einem sterilen Tuch und Anlegen des Lidhalters wird die Bindehaut mit einer Pinzette angehoben und mit einer Augenschere zirkulär eröffnet. Die Exzision des skleralen Hornhautknopfes wird mit einem um die Hornhaut zentrierten Trepan durchgeführt; bei Bedarf wird der Schnitt mit einer Schere abgeschlossen. Das prolabierte Aderhautgewebe wird mit einer stumpfen, gebogenen Schere entfernt. Die Hornhaut wird anschließend in einen Aufbewahrungsbehälter überführt und der Vorgang wird am anderen Auge wiederholt. Während der Exzision wird der Linsenstatus beurteilt und dokumentiert.

Nach der Explantation wird die Hornhaut in einem Kulturmedium (Kulturmedium I F9016, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) aufbewahrt. Die Organkultur wird in einem geschlossenen System bei einer Temperatur von 34°C Raumluft durchgeführt. Vor der Transplantation wird die Hornhaut in ein Dextran-haltiges Transportmedium (Kulturmedium II F9017, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) eingelegt. Die Dauer der Organkultur ist auf maximal 34 Tage begrenzt (19).

Während der Kultivierung werden folgende Tests durchgeführt: Die ECD1 wird zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Explantation gemessen, die ECD2 wiederum wird vor der Transplantation gemessen. Die ECD dient als Qualitätskriterium für die Eignung von Hornhauttransplantaten zur Transplantation.

Die folgende Abbildung 4 gewährt einen Überblick über den Ablauf einer typischen Hornhauttransplantation:

Material und Methoden

Entnahme vom Spender → Transport/Kühlung → ECD1 → Kultivierung → ECD2 → Transplantation	
Kühlungszeit bzw. Death-To-Explantation-Interval (Maximal 72 Stunden)	Kulturdauer (Maximal 34 Tage im Kulturmedium)
ECD1: Initiale Endothelzelldichte vor der Kultivierung, ECD2: Endgültige Endothelzelldichte nach der Kultivierung	

Abbildung 4: Ablauf einer Hornhautentnahme und deren Kultivierung. Eigene Darstellung.

Endothelzellmikroskopie

Für die Messung der ECD wird die Hornhaut in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen eingelegt, die mit 0,9 % NaCl gefüllt ist. Die Platte wird unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop platziert, und das Endothel wird mit einer Videokamera im optischen Bereich der Hornhaut als Live-Bild mit 10-facher Vergrößerung betrachtet (Nikon Eclipse TE 2000-S mit 1/3 CCD-Kamera, siehe Abbildung 5).

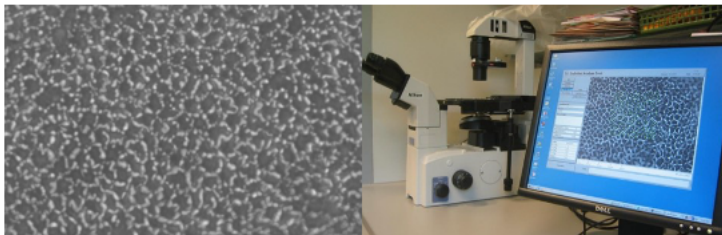


Abbildung 5: Mikroskopische Untersuchung der Endothelzelldichte

Zur Auswertung werden mindestens 3–4 Standbilder aus den zentralen und parazentralen Bereichen manuell erstellt und gespeichert. Die Größe der gespeicherten Bereiche variiert je nach Bildqualität. Die Bilderzeugung und weitere Auswertungen erfolgen mit einer speziellen Software, dem Endothel Analysis Tool (EAT) der Firma RHINE-TEC GmbH, Düsseldorf, Deutschland. Die Messung der ECD wird von drei erfahrenen Mitarbeitern der Hornhautbank durchgeführt. Die Bestimmung der ECD erfolgt durch Auswahl eines bestimmten Endothelausschnitts mit Vorgabe der Zählfeldgröße und manueller Markierung des Zellzentrums mittels der „Center“-Methode. Zudem müssen morphologische Parameter wie Anzahl der Zellen, analysierter Bereich (in μm^2), Zelldichte (in Zellen/ mm^2), Zellgrößen (minimale, maximale oder durchschnittliche Zellgröße) und statistische Parameter (Standardabweichung, abgekürzt SD, Variationskoeffizient, gemittelter Fehler) angegeben werden. Vor allem spielt die subjektive Markierung des Zellzentrums eine entscheidende Rolle in der Messung. Artefakte wie schlechter Kontrast können durch Filter minimiert werden, sodass die Zellgrenzen klar dargestellt werden und somit eine fehlerhafte Messung von

Material und Methoden

Zellzahlen und -größen vermieden werden kann. Eine weitere Einflussgröße auf die gemessene ECD ist die Fokustiefe, die durch die effektive Vergrößerung linear verändert werden kann. Je nach Dicke der Hornhaut können unterschiedliche Dichten ermittelt werden. Je dicker die Hornhaut ist, desto niedriger ist die Zelldichte zu ermitteln. Dies muss bei der Messung mittels Korrekturformel berücksichtigt werden. Vor der Transplantation wird mindestens eine zusätzliche ECD-Messung durchgeführt. In dieser Studie werden die Messungen der Werte der ECD1 und der ECD2 als Grundlage für die Auswertungen herangezogen.

Spaltlampenuntersuchung

Weiterhin wird die Spaltlampenuntersuchung (BM 9009770, Swiss Haag-Streit, Köniz, Schweiz) durchgeführt, um Anomalien in der Hornhautmorphologie (z. B. Narben, Trübungen) zu erkennen, die die Eignung der Hornhaut für eine Transplantation beeinträchtigen würden. Hornhäute, die für eine perforierende Keratoplastik aufgrund von stromalen Narben nicht geeignet sind, aber über eine ausreichende ECD verfügen, können für eine posteriore lamelläre Keratoplastik in Erwägung gezogen werden.

Mikrobiologische Kontrolle

Zwischen dem dritten und fünften Tag der Lagerung werden die Hornhäute in ein frisches Nährmedium gelegt. Aus dem vorherigen Medium werden die Proben in zwei Arten von mikrobiologischen Kulturmedien (BACTECTM, BD) überführt. Sowohl dem aeroben als auch dem anaeroben Kulturmedium wird Penicillinase (BD) zugesetzt; dem aeroben Kulturmedium wird außerdem das Supplement für anspruchsvolle Organismen (FOS, BD) zugesetzt. Alle Kulturen werden an die Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz zugeschickt und für 14 Tage inkubiert. Die früheste Aussage über den mikrobiologischen Status erfolgt am siebten Inkubationstag, dem frühestmöglichen Transplantationstermin.

4.3 Statistik

Die Statistik in dieser Arbeit wurde in allgemeine deskriptive Statistik auf Basis der spenderspezifischen Daten und in analytische Statistik anhand der ausgewerteten Ergebnisse gegliedert. In der deskriptiven Statistik wurden für quantitative Merkmale der Mittelwert (MW) \pm die Standardabweichung (SD) angegeben. Der Zusammenhang der ECD mit den kategorialen Eigenschaften wie Geschlecht, Linsenstatus und Todesursache (Malignom oder Sepsis) wurde mittels t-Test untersucht. Der Zusammenhang mit den kontinuierlichen Eigenschaften wie Spenderalter, DEI und Kulturdauer wurde mittels Pearson-Korrelation sowie linearer Regression getestet. Es wurden zweiseitig formulierte Hypothesen geprüft und 95%-Konfidenzintervalle, abgekürzt als KI berechnet. Bei der analytischen Statistik wurde die ECD in zwei verschiedenen Phasen während des gesamten Prozesses von der Entnahme bis zur Transplantation untersucht und betrachtet. Die Definition der ECD erfolgt zum einen nach der Entnahme bzw. die initiale ECD als ECD1 und zum anderen kurz vor der Transplantation bzw. die endgültige ECD als ECD2.

Um die Frage, welche Spender- und präoperativen Eigenschaften einen Einfluss auf die ECD1 haben, beantworten zu können, wurden Regressionsmodelle angepasst und es wurde schließlich ein gemischtes lineares Regressionsmodell verwendet. Da in einem Großteil der Fälle beide Hornhäute eines Spenders in die Analyse gingen, wurden Modelle mit festen wie auch zufälligen Effekten gewählt, wobei stets der Spender als zufälliger Effekt in das jeweilige Modell einbezogen wurde. Gleiches gilt auch für die ECD2 unter Hinzunahme der Kulturdauer, da die ECD2 einen Wert darstellt, der nach der Kultivierung und vor der Transplantation gemessen wird. Um die ECD1 und die ECD2 als quantitative Variablen zu modellieren, wurde das gemischte lineare Regressionsmodell unter Verwendung der SAS-Prozedur MIXED angepasst. Für die ECD1 wurden als feste Effekte Alter und DEI (jeweils quantitativ) sowie Geschlecht und Linsenstatus berücksichtigt. Für die ECD2 wurden die Effekte in gleichem Maße berücksichtigt, unter Hinzunahme von der Kulturdauer.

Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung einer Gruppe von Spenderhornhäuten im Zeitraum von 2014 bis 2017 aus der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz, die eine ECD1 ≥ 2000 Zellen/mm² aufwiesen, aber bis zur Transplantation eine Minderung der ECD auf einen Wert < 2000 Zellen/mm² zeigten. Zudem werden diejenigen Hornhäute untersucht, bei denen ursprünglich eine ECD1 < 2000 Zellen/mm² gemessen wurde, die aber in der Kultivierungsphase eine Zunahme der ECD auf den Wert ≥ 2000 Zellen/mm² aufwiesen.

Es wird berechnet, wie sich die Differenz (ECD2–ECD1) während der Kultivierung ändert, und untersucht, ob diese sich in positiver oder negativer Richtung entwickelt. In dieser Arbeit wird die Veränderung der ECD während der Kultivierung ebenfalls mit einem verallgemeinerten linearen gemischten Modell unter Verwendung der SAS-Prozedur GLIMMIX analysiert. Als feste Effekte werden zum einen analog zum Modell für die ECD2 die Spender- und präoperativen Eigenschaften inklusive der Kulturdauer berücksichtigt. Zum anderen werden die Kulturdauer und die ECD1 als einzige Einflüsseffekte betrachtet. Die Effekte werden durch Angabe der Regressionsgleichung für den Logarithmus der Odds Ratios (log Odds) sowie durch die entsprechenden Odds Ratios (OR) beschrieben. Hierbei wurde der Zusammenhang durch SGPLOT, ein Verfahren, das ein oder mehrere Diagramme generieren und sie auf einem einzigen Achsensatz überlappen kann, dargestellt.

Zur Beschreibung der Gütekriterien der Modelle wurde der Zusammenhang von beobachteten und vorhergesagten Werten mittels Streudiagrammen dargestellt. Ferner wurden ROC-Kurven erstellt und die Fläche unter den Kurven bestimmt. Dies geschah unter Verwendung der SAS-Prozedur LOGISTIC. In dieser Arbeit werden p-Werte kleiner als 0.05 als signifikant interpretiert. Eine Korrektur für multiples Testen wurde nicht vorgenommen. Die Modellierung erfolgte mit dem Statistikpaket SAS 9.4.

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie sind in deskriptive und analytische Ergebnisse unterteilt.

5.1 Deskriptive Ergebnisse

Es wurden 1092 Hornhäute von 672 Spendern im Zeitraum von 2014 bis 2017 in die Studie aufgenommen. Von 421 Spendern konnten beide Hornhäute in der Studie berücksichtigt werden, wobei von den anderen 251 Spendern nur jeweils eine Hornhaut pro Spender eingeschlossen wurde. Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden in Kapitel 4.2 beschrieben.

5.1.1 Spendereigenschaften

Die Spendereigenschaften umfassen das Geschlecht, das Spenderalter und der Linsenstatus sowie die Todesursache.

5.1.1.1 Geschlecht

Bei der deskriptiven Statistik zum Geschlecht wurde die Anzahl der Transplantate als Grundlage verwendet. Insgesamt wurden 1092 Transplantate von insgesamt 672 Spendern in das Patientenkollektiv aufgenommen. Von diesen 672 Spendern waren 388 (57,7 %) männlich und 284 (42,3 %) weiblich.

5.1.1.2 Spenderalter

Das mittlere Alter der Spender lag bei $73,0 \pm 12,7$ Jahren, wobei der jüngste 17 Jahre und der älteste 103 Jahre alt war. Die männlichen Spender waren mit einem Mittelwert von $72,3 \pm 11,9$ Jahren im Durchschnitt jünger als die weiblichen Spender mit einem Mittelwert von $74,0 \pm 13,6$ Jahren.

5.1.1.3 Linsenstatus

Der Linsenstatus wurde in zwei Kategorien erfasst: Phakie (Vorhandensein der natürlichen Linse) und Pseudophakie (Vorhandensein einer Kunstlinse).

Linsenstatus	Phak (%)	Pseudophak (%)	Total
Männlich	485 (78,2 %)	135 (21,8 %)	620
Weiblich	322 (68,2 %)	150 (31,8 %)	472
Gesamt	807 (73,9 %)	285 (26,1 %)	1092

Tabelle 2: Verteilung des Linsenstatus in der Studie.

Im untersuchten Zeitraum wies das Jahr 2016 den niedrigsten und das Jahr 2014 den höchsten Anteil von Pseudophakie auf, siehe folgende Tabelle 3.

Jahr	Phak	Pseudophak	Gesamt
2014	236 (72,6 %)	89 (27,4 %)	325
2015	179 (73,9 %)	63 (26,1 %)	242
2016	115 (68,4 %)	53 (31,6 %)	168
2017	277 (77,5 %)	80 (22,5 %)	357
Gesamt	807 (73,9 %)	285 (26,1 %)	1092

Tabelle 3: Verteilung des Linsenstatus im untersuchten Zeitraum.

5.1.1.4 Todesursache: Malignom/Sepsis

Zur Erhebung des präoperativen Status vor der Organentnahme gehört die Dokumentation der Begleiterkrankungen sowie der Haupttodesursache. In dieser Studie wurden Malignome und Sepsis als Einflusskriterien betrachtet. Dabei waren mehr Spender an Malignomen als an einer Sepsis erkrankt (35 % vs. 15 %). Männer und Frauen wiesen jeweils einen gleich hohen Anteil an Malignomen auf (jeweils 35 %), während die Sepsis bei Frauen häufiger vorkam (16 %) als bei Männern (14 %). Der höchste Anteil an Malignomen wurde im Jahr 2017 (41 %) verzeichnet; während die Sepsis am häufigsten im Jahr 2016 auftrat. Weitere Angaben für den untersuchten Zeitraum sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt.

Jahr	Malignome	Sepsis
2014	34,4 % 112 (N: 325)	11 % 36 (N: 325)
2015	34,2 % 83 (N: 242)	13,2 % 32 (N: 224)
2016	23,8 % 40 (N: 168)	24,3 % 39 (N: 168)
2107	42,4 % 148 (N: 357)	15,8 % 57 (N: 357)

Tabelle 4: Verteilung der Todesursachen im untersuchten Zeitraum.

5.1.2 Präoperative Eigenschaften

Die präoperativen Eigenschaften umfassen das Death-To-Explantation-Interval und die Kulturdauer.

5.1.2.1. Death-To-Explantation-Interval

Das DEI beschreibt den Zeitraum zwischen dem Herzkreislauf-Stillstand bzw. dem Perfusionsstopp des Gewebespenders und der Entnahme des gespendeten Gewebes am Leichnam. Für organokultivierte Hornhäute darf es 72 Stunden nicht überschreiten. Das mittlere DEI betrug $27,7 \pm 15,5$ Stunden, wobei für den untersuchten Zeitraum das kleine 1 Stunde und das große 72 Stunden betrug.

5.1.2.2. Kulturdauer

Die Kulturdauer wird in dieser Studie als einer der Faktoren betrachtet, die die Entwicklung der ECD1 zur ECD2 beeinflussen. Sie bezeichnet den Zeitraum, in dem die Transplantate nach der Entnahme bis zur Transplantation im Kulturmedium verbleiben. Die maximale Kulturdauer sollte 34 Tage nicht überschreiten. Die längste Kulturdauer betrug 28 Tage, die kürzeste 7 Tage. Der Mittelwert betrug 11,1 Tage mit einer Standardabweichung von 3,9.

Der Mittelwert variierte auch innerhalb des untersuchten Zeitraums. Der kürzeste lag im Jahr 2014 bei $10,4 \pm 3,4$, gefolgt vom Mittelwert im Jahr 2015 ($11,2 \pm 4,2$), im Jahr 2016 ($11,4 \pm 3,4$) und im Jahr 2017 ($11,4 \pm 4,2$). Die Daten sind in der Abbildung 6 grafisch dargestellt.

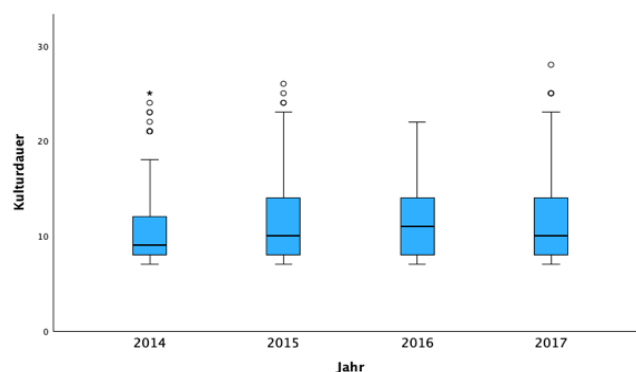


Abbildung 6: Verteilung der Kulturdauer (in Tagen) im untersuchten Zeitraum.

5.1.3 Zielgrößen

Zu den Zielgrößen gehört die Endothelzelldichte vor und nach der Kultivierung.

5.1.3.1. Zielgröße: Initiale Endothelzelldichte (ECD1)

Die durchschnittliche ECD1 innerhalb der in die Studie einbezogenen Hornhäute Mindestwert $ECD \geq 1500$ Zellen/ mm^2) lag bei 2314 ± 325 Zellen/ mm^2 . Die maximale Zelldichte lag bei 3350 Zellen/ mm^2 , die minimale bei 1526 Zellen/ mm^2 . Im untersuchten Zeitraum wurde der höchste Mittelwert der ECD1 im Jahr 2016 mit 2357 Zellen/ mm^2 verzeichnet, gefolgt von den Mittelwerten der Jahre 2017, 2015 und 2014 mit jeweils 2340 , 2306 und 2268 Zellen/ mm^2 , wie die folgende Abbildung 7 zeigt.

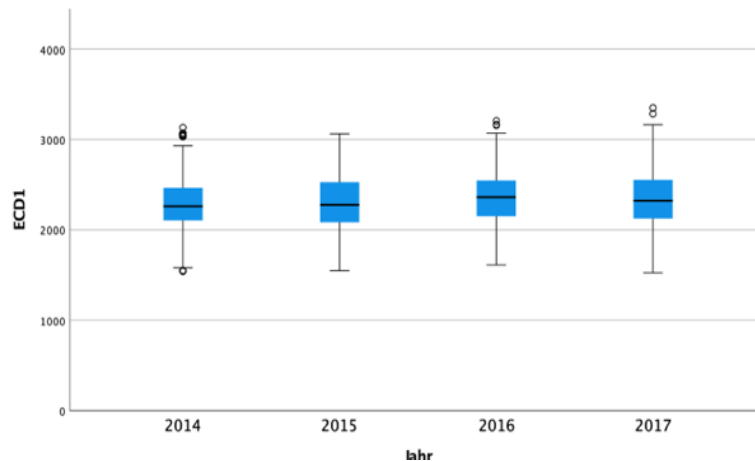


Abbildung 7: Verteilung des Mittelwertes der ECD1 im untersuchten Zeitraum.

5.1.3.1.1 Zusammenhang zwischen ECD1 und Geschlecht

Bezüglich des Geschlechts ließ sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der ECD1 feststellen (männliche Spender $2301,8 \pm 322$ Zellen/ mm^2 , weibliche Spender $2330,5 \pm 327$ Zellen/ mm^2 , p-Wert 0,7).

5.1.3.1.2 Zusammenhang zwischen ECD1 und Alter

Die Auswertung der Studie zeigt signifikante Unterschiede im Mittelwert der ECD1 zwischen den verschiedenen Altersstufen. Insbesondere die Gruppe der unter 50-Jährigen unterscheidet sich deutlich von der Gruppe der über 90-Jährigen, mit einem Unterschied von mehr als 200 Zellen/ mm^2 (p-Wert $< 0,001$). Die detaillierten Ergebnisse sind in der Tabelle 5 darstellt.

Altersstufen	ECD1 MW \pm SD (Zellen/mm ²)	N
Altersstufe 1: < 50 Jahre	2486 \pm 322	45
Altersstufe 2: 50–59 Jahre	2412 \pm 300	112
Altersstufe 3: 60–69 Jahre	2368 \pm 321	237
Altersstufe 4: 70–79 Jahre	2290 \pm 322	331
Altersstufe 5: 80–89 Jahre	2255 \pm 324	280
Altersstufe 6: > 90 Jahre	2231 \pm 269	87

Tabelle 5: Verteilung des Mittelwerts der ECD1 in verschiedenen Altersstufen.

5.1.3.1.2 Zusammenhang zwischen ECD1 und Linsenstatus

In der Gruppe der Pseudophakie betrug der Mittelwert der ECD1 2190 \pm 297 Zellen/mm² (N = 285) und in der Gruppe der Phakie bei 2357 \pm 323 Zellen/mm² (N = 807), (p-Wert < 0,001), wie folgende Abbildung 8 veranschaulicht.

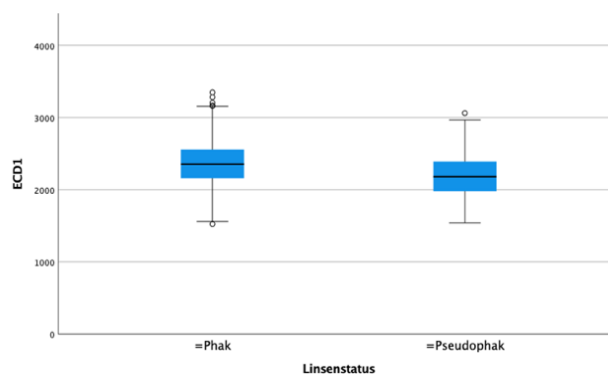


Abbildung 8: Verteilung des Mittelwerts der ECD1 in Abhängigkeit vom Linsenstatus.

5.1.3.1.3 Zusammenhang zwischen ECD1 und der Todesursache

In der Gruppe von Spendern mit Malignom war die ECD1 höher als bei Spendern ohne Malignom (2349 \pm 294 vs. 2295 \pm 338 Zellen/mm²; p-Wert 0,004). Dieser Effekt zeigte sich in der Sepsis-Gruppe nicht. Es bestand kein Unterscheid im Mittelwert der ECD1 zwischen Verstorbenen mit und ohne Sepsis (2325 \pm 325 vs. 2312 \pm 325; p-Wert 0,8).

5.1.3.1.4 Zusammenhang zwischen ECD1 und Death-To-Explantation-Interval

Die ECD1 zeigte eine Abhängigkeit vom DEI, wobei kürzere DEI-Werte mit höheren ECD1-Werten assoziiert waren. Unter Berücksichtigung des Qualitätskriteriums, dass der ECD1-Wert für optische Transplantate \geq 2000 Zellen/mm² sein sollte, zeigte sich, dass in den meisten Fällen mit ECD1 \geq 2000 Zellen/mm² das DEI unter 24 Stunden lag.

ECD1	DEI < 24h	DEI 24–48 h	DEI > 48 h	Gesamt
< 2000 Zellen/mm ² (nicht-optisch)	89 14,6 %	58 16,4 %	40 31 %	187
≥ 2000 Zellen/mm ² (optisch)	521 85,4 %	295 83,6 %	89 69%	905
Gesamt	610	353	129	1092

Tabelle 6: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten je nach Death-To-Explantation-Interval in Stunden (h).

5.1.3.2 Zielgröße: Endgültige Endothelzelldichte (ECD2)

Die durchschnittliche ECD2 lag bei 2398 ± 310 Zellen/mm². Die maximale Zelldichte lag bei 3531 Zellen/mm², die minimale bei 1236 Zellen/mm². Im untersuchten Zeitraum wurde der höchste Mittelwert der ECD2 im Jahr 2017 mit 2485 ± 331 Zellen/mm² verzeichnet, gefolgt von den Mittelwerten der Jahre 2016, 2015 und 2014 mit jeweils 2454 ± 266 , 2385 ± 302 und 2288 ± 284 Zellen/mm²), wie die folgende Abbildung 9 zeigt.

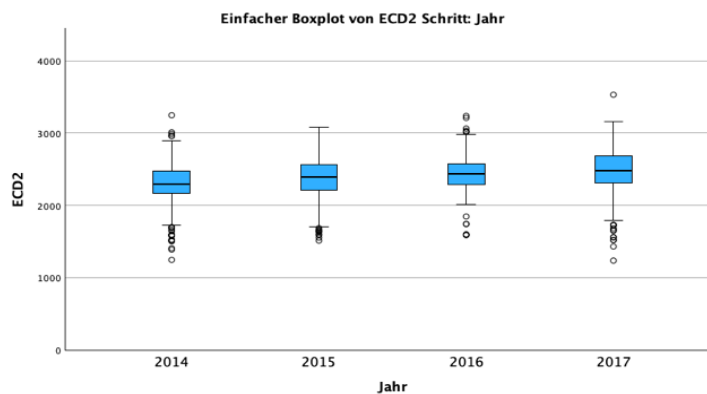


Abbildung 9: Verteilung des Mittelwerts ECD2 im untersuchten Zeitraum.

5.1.3.2.1 Zusammenhang zwischen ECD2 und Geschlecht

Bezüglich des Geschlechts ließ sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der ECD2 feststellen (männliche Spender 2400 ± 306 Zellen/mm², weibliche Spender 2399 ± 319 Zellen/mm²), p-Wert 0,6.

5.1.3.2.2 Zusammenhang zwischen ECD2 und Spenderalter

Bezüglich des Mittelwertes der ECD2 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen: Am höchsten war der Mittelwert der ECD2 bei Spendern unter 50 Jahre und am niedrigsten bei Spendern über 80 Jahre, p-Wert 0,001, siehe Tabelle 7.

Altersstufe	ECD2 MW \pm SD (Zellen/mm ²)	N
Altersstufe 1: < 50 Jahre	2491 \pm 273	45
Altersstufe 2: 50–59 Jahre	2492 \pm 298	112
Altersstufe 3: 60–69 Jahre	2470 \pm 309	237
Altersstufe 4: 70–79 Jahre	2368 \pm 300	331
Altersstufe 5: 80–89 Jahre	2338 \pm 330	280
Altersstufe 6: >90 Jahre	2359 \pm 270	87

Tabelle 7: Verteilung des Mittelwertes der ECD2 in verschiedenen Altersstufen.

5.1.3.2.3 Zusammenhang zwischen ECD2 und Linsenstatus

In der Gruppe der Pseudophakie betrug der Mittelwert der ECD2 2273 \pm 308 Zellen/mm² und in der Gruppe der Phakie betrug er 2444 \pm 301 (p-Wert < 0,001), wie folgende Abbildung 10 zeigt.

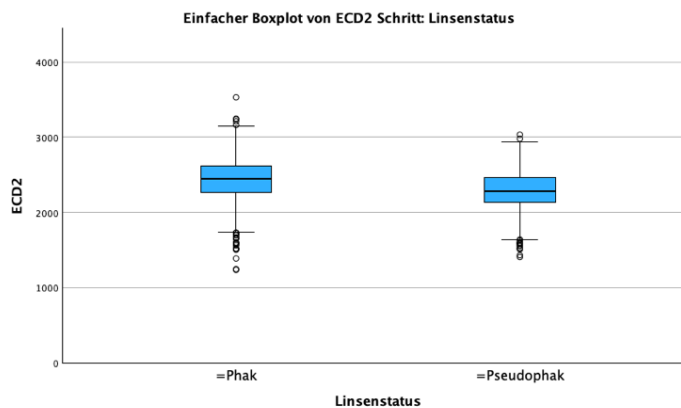


Abbildung 10: Verteilung des Mittelwertes der ECD2 nach Linsenstatus.

5.1.3.2.4 Zusammenhang zwischen ECD2 und der Todesursache

In der Gruppe der Spender mit Malignom war die ECD2 signifikant höher als bei den Spendern ohne Malignom (2429 \pm 294 Zellen/mm² vs. 2383 \pm 320 Zellen/mm²; p-Wert 0,02). Dieser Effekt zeigte sich in der Sepsis-Gruppe nicht. Es bestand kein Unterschied im Mittelwert der ECD2 zwischen Spendern mit und ohne Sepsis (2385 \pm 321 Zellen/mm² vs. 2402 \pm 310 Zellen/mm²; p-Wert 0,53).

5.1.3.2.5 Zusammenhang zwischen ECD2 und Death-To-Explantation-Interval (DEI)

Der höchste Anteil optischer Transplantate ($ECD2 \geq 2000$ Zellen/ mm^2) wurde bei einem DEI von weniger als 24 Stunden beobachtet, Die Daten sind Tabelle 8 grafisch dargestellt.

ECD2	DEI < 24h	DEI 24–48h	DEI > 48h	Gesamt
< 2000 Zellen/ mm^2 (nicht-optisch)	39 6,3 %	37 10,5 %	19 14,7 %	
≥ 2000 Zellen/ mm^2 (optisch)	571 93,6 %	316 89,5 %	110 85,3 %	
Gesamt	610	353	129	1092

Tabelle 8: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten je nach DEI in Stunden (h).

5.1.3.2.6 Zusammenhang zwischen ECD2 und Kulturdauer

In Bezug auf die Kulturdauer zeigte sich eine höhere ECD2, je kürzer die Kulturdauer war. Die höchste ECD2 lag nach Kultivierung in der Gruppe (7 Tage) mit 2414 Zellen/ $mm^2 \pm 283$, gefolgt mit geringem Unterschied von der Gruppe (8–14 Tage) mit 2410 ± 306 Zellen/ mm^2 . Der niedrige Mittelwert lag in den anderen Gruppen (15–21 und 22–28 Tage) bei 2362 ± 355 Zellen/ mm^2 bzw. 2220 ± 306 Zellen/ mm^2 . Der Unterschied zum Mittelwert zeigte sich zwischen den Gruppen 7 Tage und 22–28 Tage signifikant, p-Wert 0,001.

Kulturdauer	ECD2 Mittelwert \pm SD	≥ 2000 Zellen/ mm^2	< 2000 Zellen/ mm^2
7 Tage	2410 ± 276	196 (19,6 %)	15 (1,0 %)
8–14 Tage	2411 ± 309	655 (65,6 %)	53 (55,7 %)
15–21 Tage	2347 ± 351	124 (12,4 %)	23 (24,2 %)
22–28 Tage	2244 ± 317	22 (2,2 %)	4 (4,2 %)
Gesamt	2398 ± 310	997	95

Tabelle 9: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten abhängig von der Kulturdauer.

5.2 Analytische Ergebnisse

Die analytische Analyse gliedert sich in univariable und multivariable Analyse, jeweils in Bezug auf ECD1 und ECD2 sowie Änderung der ECD1 zu ECD2.

5.2.1. Univariable Analyse:

Kategoriale Variablen

Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen ECD1 und ECD2 sowie den kategorialen Eigenschaften Geschlecht, Linsenstatus, Malignom/Sepsis wurde der t-Test durchgeführt, mit dem die Mittelwerte von ECD1 und ECD2 zwischen den Gruppen verglichen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Der Linsenstatus mit Pseudophakie hatte einen negativen Einfluss auf ECD1 und ECD2, während das Vorhandensein eines Malignoms einen positiven Einfluss auf ECD (jeweils ECD1 und ECD2) hatte.

Variable	Einfluss	t-Test, ECD1	t-Test, ECD2
Geschlecht (m/w)	Kein Einfluss	p-Wert = 0,147	p-Wert = 0,946
Linsenstatus: Pseudophakie	Negativer Einfluss	p-Wert < 0,001	p-Wert < 0,001
Vorhandensein eines Malignoms	Positiver Einfluss	p-Wert = 0,008	p-Wert = 0,020
Vorhandensein einer Sepsis	Kein Einfluss	p -Wert = 0,638	p-Wert = 0,520

Tabelle 10: Zusammenhang von ECD1/ECD2 mit kategorialen Variablen; p: Signifikanzwert.

Kontinuierliche Variablen

Bei den kontinuierlichen Variablen wurde zum einen der Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 mit den kontinuierlichen Variablen der Spendereigenschaften, insbesondere dem Spenderalter, und zum anderen mit den präoperativen Eigenschaften wie DEI und Kulturdauer untersucht. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 analysiert.

Bei der Kulturdauer wurde nur der Zusammenhang zwischen der Kulturdauer und der ECD2 berücksichtigt, da die ECD2 die ECD nach der Kultivierung widerspiegelt und die Kulturdauer keinen Bezug zur ECD1 vor der Kultivierung hat. Die Tabellen 11 und 12 sowie die Abbildungen 11–16 zeigen Korrelationen zwischen der ECD und dem Spenderalter (p-Wert < 0,001), dem DEI (jeweils p-Wert < 0,001) und der Kulturdauer (p-Wert < 0,002). Die ECD ist niedriger, je älter der Spender und je länger das DEI. In Bezug auf die Kulturdauer ergab sich eine signifikante lineare Regression, je länger die Kulturdauer pro Tag, desto niedriger die ECD2 war (p-Wert < 0,002). Die Pearson-Korrelation sowie die lineare

Ergebnisse

Regression zwischen ECD1 und ECD2 waren positiv (p-Wert < 0,001). Je höher die ECD1 vor der Kultivierung, desto höher war die ECD2 nach der Kultivierung.

Variable	Korrelation nach Pearson	Regression
Spenderalter ECD1 *	Korrelationskoeffizient R = -218; p-Wert < 0,001	Lineare Regression Regressionskoeffizient = ECD1 -5,558 Zellen/mm ² pro Jahr, p- Wert < 0,001
Spenderalter ECD2 *	Korrelationskoeffizient R = -0,191; p-Wert < 0,001	Lineare Regression Regressionskoeffizient = ECD2 -4,684 Zellen/mm ² pro Jahr, p-Wert < 0,001

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 und dem Spenderalter;
R: Korrelation/Regressionskoeffizient; p: Signifikanzwert.

Variable	Korrelation nach Pearson	Regression
DEI und ECD1	Korrelationskoeffizient R = -0,167; p-Wert < 0,001	Lineare Regression Regressionskoeffizient = ECD1 -3,489 Zellen/mm ² pro Stunde; p-Wert < 0,001
DEI und ECD2	Korrelationskoeffizient R = -0,176; p-Wert < 0,001	Lineare Regression Regressionskoeffizient = ECD1 -3,537 Zellen/mm ² pro Stunde; p-Wert < 0,001
Kulturdauer und ECD2	Korrelationskoeffizient R = -0,122, p-Wert 0,001	Lineare Regressionsmodell Regressionsgleichung = ECD2 -9,670 Zellen/mm ² pro Tag im Kulturmedium; p-Wert =0,002
ECD1 und ECD2	Korrelationskoeffizient R = +0,740; p-Wert 0,001	Lineare Regression Regressionskoeffizient = ECD2 +0,710 Zellen/mm ² pro Zellen/mm ² ; p-Wert < 0,001

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 und den präoperativen Eigenschaften
(DEI und Kulturdauer); R: Korrelation/Regressionskoeffizient; p: Signifikanzwert.

Ergebnisse

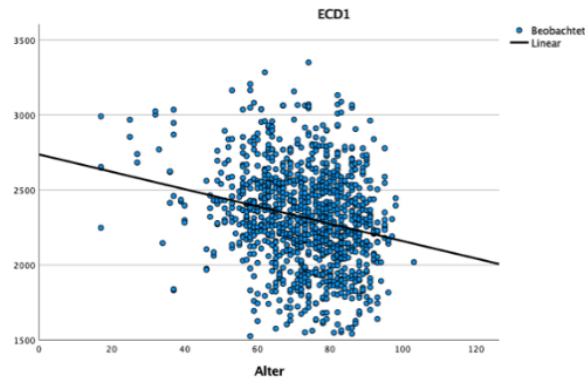


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen ECD1 und Spenderalter.

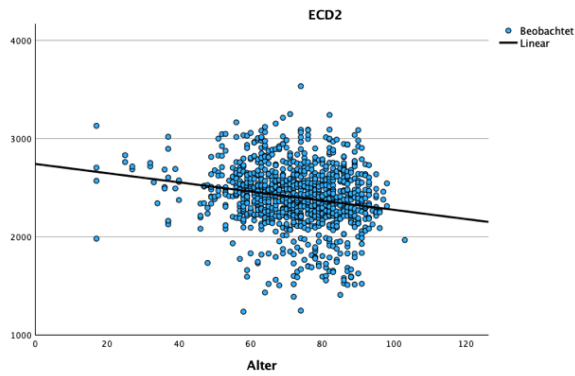


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen ECD2 und Spenderalter.

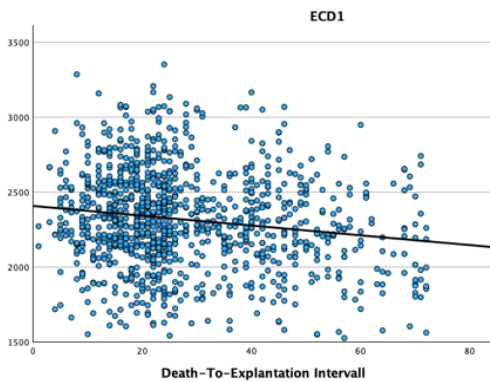


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen ECD1 und Death-To-Explantation-Intervall.

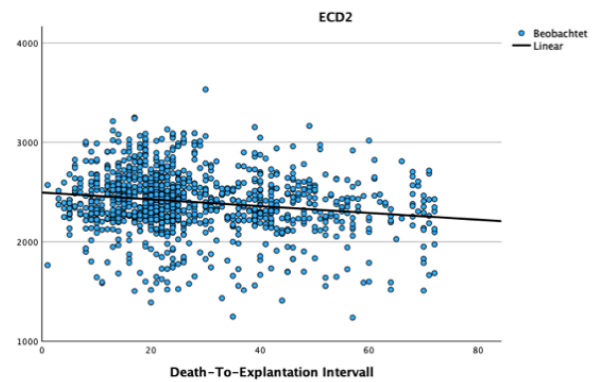


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen ECD2 und Death-To-Explantation-Intervall.

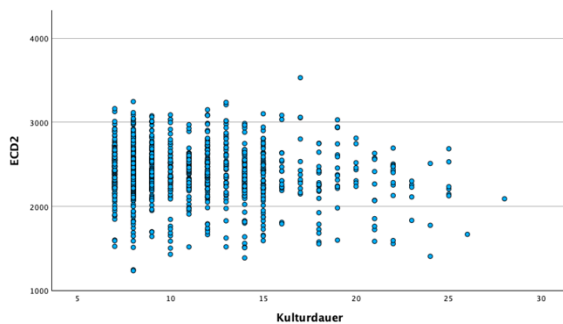


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen ECD2 und Kulturdauer.

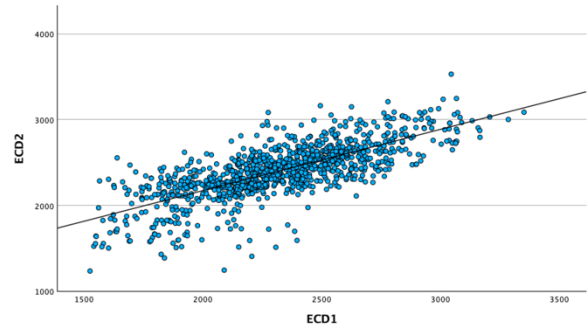


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2.

5.2.2 Multivariable Analyse

In der multivariaten Analyse wird zunächst die ECD1 als Zielgröße untersucht. In einem zweiten Schritt wird zusätzlich die ECD 2 als Zielgröße untersucht.

5.2.2.1 ECD1 als Zielgröße

In diesem Kapitel wird das Vorhersagemodell für den Einfluss von Spender- und präoperativen Merkmalen auf die ECD1 anhand eines gemischten linearen Modells dargestellt: Die Regressionsgleichung für die ECD1 (mit jeweils gerundeten Regressionskoeffizienten) ergab sich als:

$$\text{ECD1} = 2723 + 43.7 \text{ weiblich} + 28.2 \text{ Sepsis} + 25.5 \text{ Malignom} - 123.3 \text{ Pseudophakie} - 4.59 \text{ Alter in Jahren} - 3.36 \text{ DEI in Stunden.}$$

Dabei ist bei den binären Einflussgrößen jeweils 1 für, liegt vor' und 0 für, liegt nicht vor' einzusetzen. Die Effekte von Alter, Linsenstatus und DEI waren signifikant.

Variable	p-Wert
Alter	< 0.0001
DEI	< 0.0001
Geschlecht	0.059
Sepsis	0.375
Malignom	0.295
Linsenstatus	< 0.0001

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der ECD1 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

Die folgende Grafik veranschaulicht den Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD1 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

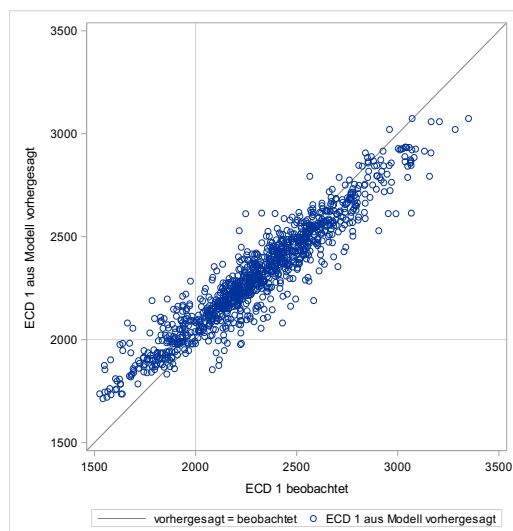


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD1 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

Ergebnisse

Vorhersage durch Modell		Beobachtet		
		ECD1 < 2000 Zellen/mm ²	ECD1 ≥ 2000 Zellen/mm ²	Total
ECD1 < 2000 Zellen/mm ²	Absolute Häufigkeit	120	12	960
	Zeilenprozent	90.9 %	9.1 %	
	Spaltenprozent	65.2 %	1.3 %	
ECD1 ≥ 2000 Zellen/mm ²	Absolute Häufigkeit	64	896	1092
	Zeilenprozent	6.7 %	93.3 %	
	Spaltenprozent	34.8 %	98.7 %	
Total		184	908	132

Tabelle 14: Vorhersagemodell von Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie der Kulturdauer auf die ECD2 quantitativ während der Kultivierung mittels gemischten linearen Modells.

Bei niedrigen ECD1-Werten neigt das Modell dazu, die Werte zu überschätzen, bei hohen ECD1-Werten neigt es dazu, die Werte zu unterschätzen. Wenn der Grenzwert von 2000 Zellen/mm² als Qualitätskriterium für optische Transplantate festgelegt wird, würden 98,7 % der geeigneten Hornhäute korrekt als geeignet erkannt. Allerdings würden auch 34,8 % der ungeeigneten Hornhäute fälschlicherweise als geeignet kategorisiert. Da insgesamt 83,2 % der Hornhäute geeignet waren, waren 93,3 % der durch das Modell als geeignet klassifizierten Hornhäute tatsächlich geeignet, während 90,9 % der als ungeeignet klassifizierten Hornhäute tatsächlich als ungeeignet erkannt wurden.

Insgesamt wurden 1016 Hornhäute (120 nicht operabel und 896 operabel) untersucht, wobei 93,0 % der Hornhäute durch das Modell korrekt klassifiziert wurden.

Wenn alle möglichen Schranken berücksichtigt werden, ergibt sich eine ROC-Kurve, wie die folgende Abbildung 18 zeigt. Die zugehörige Fläche unter der Kurve (AUC) beträgt 0.9732, mit einem 95%-KI: 0.9641; 0.9822.

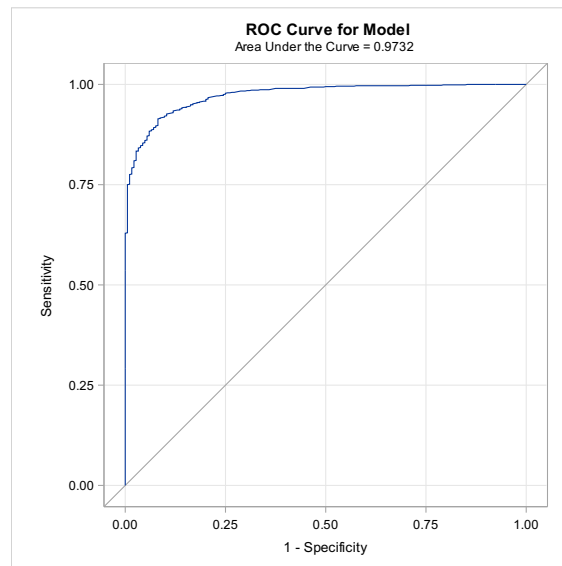


Abbildung 18: ROC-Kurve für das Vorhersagemodell von ECD1 als quantitative Variable.

5.2.2.2 ECD2 als Zielgröße:

Im Folgenden wird das Vorhersagemodell für den Einfluss von Spender- und präoperativen Merkmalen (DEI und Kultivierungsdauer) auf die ECD2 während der Kultivierung auf der Grundlage einer quantitativen Analyse mit einem gemischten linearen Modell beschrieben: Die Regressionsgleichung für die ECD2 ergab sich als (die Regressionskoeffizienten jeweils gerundet):

$$\text{ECD2} = 2773.25 - 3.008 \text{ Alter in Jahren} - 3.487 \text{ DEI in Stunden} + 19.648 \text{ weiblich} + 5.310 \text{ Sepsis} + 18.640 \text{ Malignom} - 132.24 \text{ Pseudophakie} - 5.5817 \text{ Kulturdauer in Tagen.}$$

Variable	p-Wert
Alter	0,0015
DEI	< .0001
Geschlecht	0,379
Sepsis	0,862
Malignom	0,427
Linsenstatus	< .0001
Kulturdauer	0,038

Tabelle 15: Vorhersagemodell von Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie der Kulturdauer auf die ECD2 quantitativ während der Kultivierung mittels gemischten linearen Modells.

Spenderalter, DEI und Linsenstatus beeinflussten den ECD2-Wert ebenso wie die Kulturdauer signifikant, wobei der Effekt der Kulturdauer am schwächsten war. Bei alleiniger Betrachtung der Kulturdauer und der ECD1 als Einflussfaktoren zeigt sich der Einfluss der ECD1 als signifikant (p-Wert < 0,0001); die Kulturdauer zeigte nur einen negativen Trend ohne signifikanten Einfluss mit einem p-Wert 0,182. Die folgende Grafik in Abbildung 19

Ergebnisse

veranschaulicht den Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD2 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

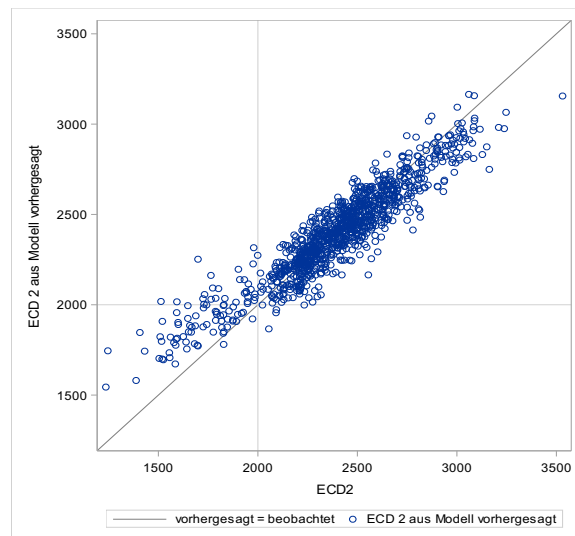


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für ECD2 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

Vorhersage durch Modell		Beobachtet		
		ECD2 < 2000 Zellen/mm ²	ECD2 ≥ 2000 Zellen/mm ²	Total
ECD2 < 2000 Zellen/mm²	Absolute Häufigkeit	64	5	69
	Zeilenprozente	92,7 %	7,2 %	
	Spaltenprozente	67,3 %	0,5 %	
ECD2 ≥ 2000 Zellen/mm²	Absolute Häufigkeit	31	992	1023
	Zeilenprozente	3,1 %	96,9 %	
	Spaltenprozente	32,6 %	99,5 %	
Total		95	997	1092

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD2 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.

Analog zu ECD1 ist hier ebenfalls aus der Grafik zu erkennen, dass bei niedrigen ECD2-Werten neigt das Modell zur Überschätzung, bei hohen ECD2-Werten zur Unterschätzung der Werte.

Beim Festlegen des Grenzwerts für die Eignung zur Operabilität bei 2000 Zellen/mm² wurden 99,5 % der tatsächlich geeigneten Hornhäute durch das Modell korrekt erkannt, wohingegen 32,6 % der ungeeigneten Hornhäute fälschlicherweise als geeignet klassifiziert wurden. Da

Ergebnisse

insgesamt 91,3 % (997 von insgesamt 1092) der Hornhäute tatsächlich geeignet waren, waren 97,0 % der durch das Modell als geeignet klassifizierten Hornhäute tatsächlich geeignet. Von den als ungeeignet klassifizierten Hornhäuten wurden 92,8 % (67,3 von insgesamt 69) korrekt als ungeeignet erkannt. Insgesamt wurden 1056 Hornhäute (96,7 %) durch das Modell korrekt klassifiziert. Wenn alle möglichen Schwellenwerte berücksichtigt werden, ergibt sich die in der nächsten Abbildung dargestellte ROC-Kurve. Die zugehörige Fläche unter der Kurve (AUC) beträgt 0,9821 mit einem 95%-KI von [0,9717; 0,9925].

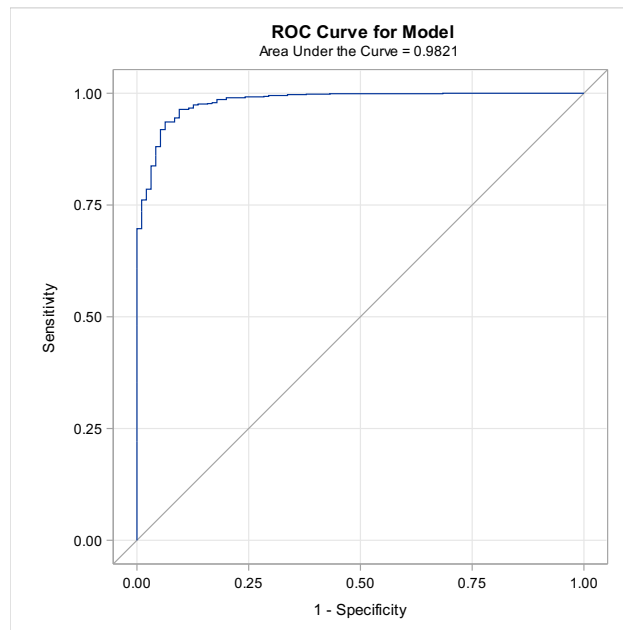


Abbildung 20: ROC-Kurve für Vorhersagemodell von ECD2 als quantitative Variable.

5.2.2.3 Änderung der Endothelzellichte

Bei den Spenderhornhäuten, die in ihrer ECD während der Kultivierungsphase eine entweder positive oder negative Veränderung zeigten, wurde der Wert der ECD1 von dem der ECD2 subtrahiert und diese Differenz als Entwicklung definiert. Im Anschluss wurde der Zusammenhang dieser Entwicklung mit den Spender- und präoperativen Eigenschaften als Einflussgrößen untersucht. Hierbei wurde die Entwicklung durch das logistische Regressionsmodell beobachtet; der Zusammenhang durch SGPLOT dargestellt.

Szenario 1: Negative Entwicklung der ECD in der Kultivierungsphase; ECD1 \geq 2000 Zellen/mm² und ECD 2 < 2000 Zellen/mm².

Es lässt sich lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kulturdauer und der negativen Entwicklung der ECD feststellen, wobei die Restfaktoren keinen signifikanten Zusammenhang zeigen. Die Regressionsgleichung für die log Odds ergab sich folgendermaßen (Regressionskoeffizienten jeweils gerundet):

log Odds = – 5.2929 + 0,001 Alter in Jahren + 0,018 DEI in Stunden– 0,4986 weiblich – 0,194 Sepsis – 0,110 Malignom + 0,489 Pseudophakie + 0,100 Kulturdauer in Tagen.

Aus dem logistischen Modell ergeben sich folgende Odds Ratios in der Tabelle 17:

Variable	p-Wert	OR	95%-Konfidenzintervall
Alter (pro Jahr)	0,91	1.002	[0.967; 1.038]
DEI (pro Stunde)	0,16	1.018	[0.993; 1.045]
Geschlecht (weiblich vs. männlich)	0,26	0.607	[0.250; 1.474]
Sepsis (ja vs. nein)	0,76	0.823	[0.235; 2.885]
Malignom (ja vs. nein)	0,80	0.895	[0.365; 2.196]
Linsenstatus (pseudophak vs. phak)	0,32	1.632	[0.619; 4.302]
Kulturdauer (pro Tag)	0,02	1.106	[1.014; 1.206]

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie Kulturdauer auf negative Änderung der ECD durch das logistische Regressionsmodell.

Lediglich die Kulturdauer zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit der negativen Konversion, was bedeutet, dass mit zunehmender Kulturdauer die Chance steigt, dass eine negative Konversion eintritt.

Der negative Einfluss der Kulturdauer auf die Entwicklung der ECD1 zur ECD2 während der Kultivierung wurde innerhalb der jeweiligen Gruppen der ECD1 anhand des Grenzwerts von 2000 Zellen/mm² (ECD1 < 2000 Zellen/mm² vs. ≥ 2000 Zellen/mm²) verglichen. Die Daten sind in grafisch in der dargestellt, siehe X-Achse.

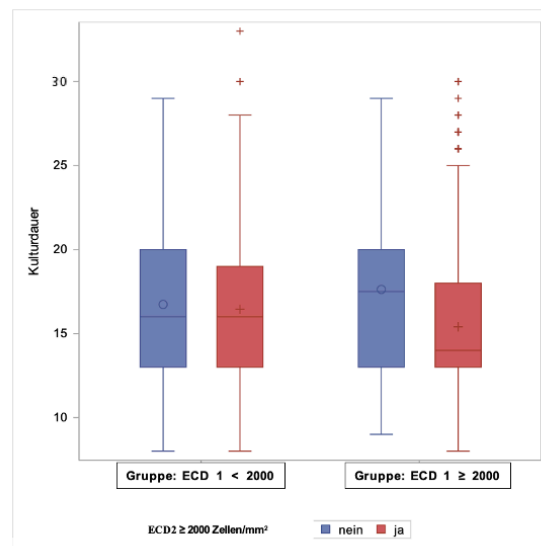


Abbildung 21: Verschiedene Effekte der Kulturdauer auf die Entwicklung der ECD1 zur ECD2 zwischen den Gruppen; ECD1 < 2000 Zellen/mm² und ECD1 ≥ 2000 Zellen/mm².

Es zeigte sich ein Effekt bei der negativen Entwicklung von Transplantaten, die initial eine ECD1 ≥ 2000 Zellen/mm² aufwiesen: Je länger die Kulturdauer, desto häufiger fiel die ECD2 unter den Grenzwert von 2000 Zellen/mm² (rechte Seite, blau: ECD2 < 2000 Zellen/mm², rot: ECD2 ≥ 2000 Zellen/mm²). Bei Transplantaten mit einer initial niedrigeren ECD1 (< 2000 Zellen/mm², linker Balken) zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied, selbst bei einer längeren Kulturdauer.

Wenn jedoch allein die Kulturdauer und die ECD1 als Einflussfaktoren auf die Entwicklung betrachtet werden, zeigt sich, dass neben dem negativen Effekt der Kulturdauer die ECD1 ein starker Faktor mit signifikant positivem Einfluss ist. Das bedeutet: Je höher die ECD1 vor der Kultivierung ist, desto unwahrscheinlicher ist eine negative Entwicklung.

Die logistische Regression ergab ein OR von 0.9944 mit einem 95 %-KI von [0.991; 0.997], p-Wert < 0.0001) je Zelle/mm² für eine Konversion und ein OR von 1.108 mit einem 95 %-KI von [1.013; 1.211], p-Wert 0.0244) pro Tag der Kulturdauer.

Ergebnisse

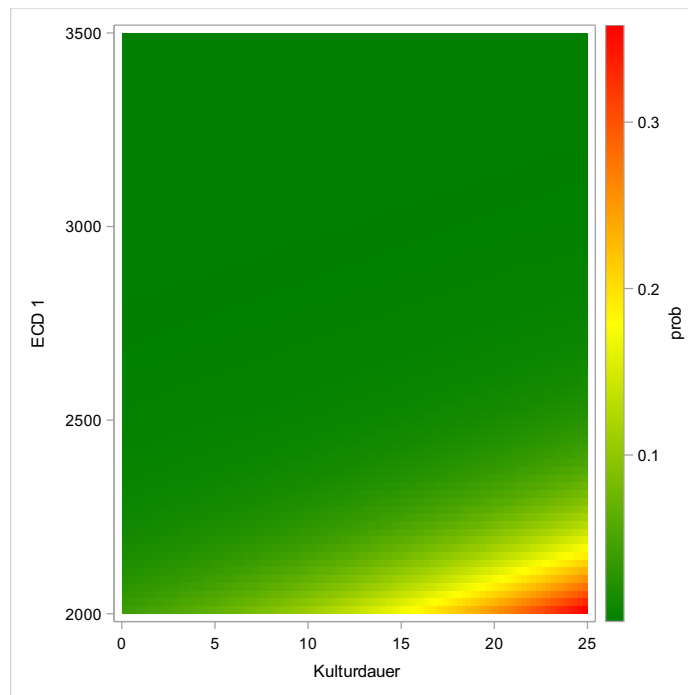


Abbildung 22: Wahrscheinlichkeit für Konversion von der endgültigen ECD < 2000 Zellen/mm² in Abhängigkeit der ECD1 und Kulturdauer. Farbkodierung: grün: Wahrscheinlichkeit, dass ECD2 ≥ 2000 Zellen/mm², gelb: grenzwertig, rot: < 2000 Zellen/mm².

Die Abbildung 22 zeigt, dass der negative Effekt einer langen Kulturdauer für die Transplantate mit $ECD1 \geq 2000$ Zellen/mm² ausgeprägter ist, je näher die ECD1 am Grenzwert von 2000 Zellen/mm² liegt.

Ab Tag 16 liegt das Risiko einer negativen Konversion für die Transplantate mit einer ECD von 2000 Zellen/mm² bei über 20 %, wohingegen es bei Zellen mit $ECD \geq 2200$ Zellen/mm² auch bei längeren Kulturzeiten unter 10 % bleibt. Dies kann damit erklärt werden, dass die sehr hohe ECD, die weit über dem Grenzwert 2000 Zellen/mm² liegt, den Verlust kompensiert und damit auch der negativen Konversion entgegenwirkt. Wenn sich die ECD1 um eine Zelle/mm² erhöht, wird das Odds Ratio für die Konversion zu $ECD2 < 2000$ Zellen/mm² um einen Faktor von 0.994 reduziert. Das bedeutet: Je größer die ECD1 ist, desto unwahrscheinlicher ist es, dass die ECD2 auf < 2000 Zellen/mm² sinkt. Wenn außerdem die Kulturdauer um einen Tag länger wird, erhöht sich das Odds Ratio für Konversion zur ECD < 2000 Zellen/mm² um den Faktor 1.108. Solange das Risiko eher gering ist, sind Odds Ratio und relatives Risiko annähernd gleich. Damit kann (näherungsweise) festgestellt werden, dass sich das Risiko für [eine] Konversion pro Einheit (Tag) bei gleichbleibendem Wert der ECD1 um 10.8 % erhöht.

**Szenario 2: Positive Entwicklung der ECD in der Kultivierungsphase;
ECD 1 < 2000 Zellen/mm² und ECD 2 ≥ 2000 Zellen/mm².**

Die Regressionsgleichung für log Odds ergab sich folgendermaßen (Regressionskoeffizienten jeweils gerundet):

log Odds = 2.4865 – 0.016 Alter in Jahren – 0.007 DEI in Stunden – 0.231 weiblich – 0.399 Sepsis 0.018 Malignom – 0.413 Pseudophakie – 0.017 Kulturdauer in Tagen.

Es lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem der Einflussfaktoren und der positiven Entwicklung der ECD feststellen.

Aus dem logistischen Modell ergeben sich folgende Odds Ratios:

Variable	p-Wert	OR	95%-Konfidenzintervall
Alter (pro Jahr)	0,39	0.984	[0.947; 1.023]
DEI (pro Stunde)	0,41	0.992	[0.973; 1.011]
Geschlecht (weiblich vs. männlich)	0,51	0.793	[0.387; 1.628]
Sepsis (ja vs. nein)	0,39	0.671	[0.261; 1.722]
Malignom (ja vs. nein)	0,96	1.019	[0.458; 2.266]
Linsenstatus (pseudophak vs. phak)	0,27	0.661	[0.309; 1.416]
Kulturdauer (pro Tag)	0,65	0.983	[0.910; 1.061]

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie Kulturdauer und positiver Änderung der ECD durch das logistische Regressionsmodell.

Werden allein die ECD1 und die Kulturdauer als Einflussfaktoren auf die Entwicklung der ECD1 zu ECD2 betrachtet, besteht ein signifikanter Einfluss der ECD1 auf die Entwicklung. Die Kulturdauer hat dann allerdings keinen Effekt.

Die logistische Regression ergab ein OR von 1.006 (95%-KI = [1.003; 1.009], p = 0.0004) je Zelle/mm² für eine Konversion und ein OR von 0.996 (95% KI = [0.924;1.075], p = 0.0212) je Tag Kulturdauer.

Ergebnisse

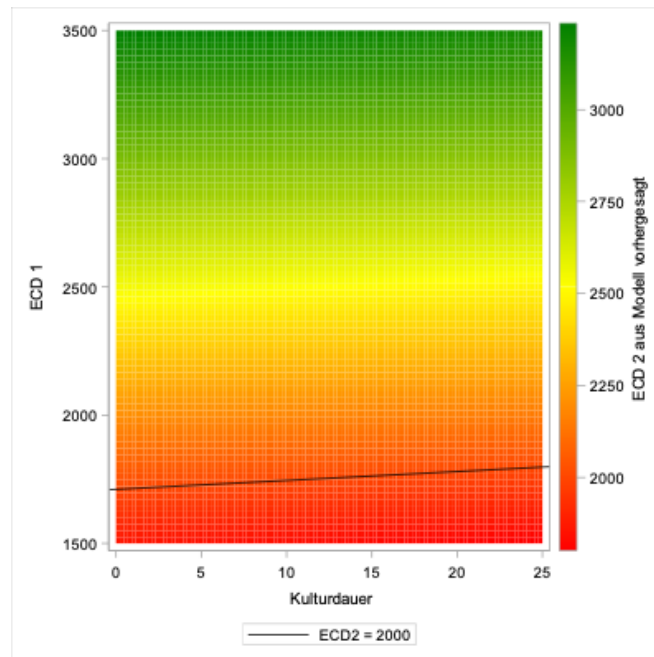


Abbildung 23: Aus Modell vorhergesagte ECD2 in Abhängigkeit von ECD1 und Kulturdauer, Farbkodierung: ECD2 2000 Zellen/mm², grün: Wahrscheinlichkeit, dass ECD2 \geq 2000 Zellen/mm², gelb: grenzwertig, rot: < 2000 Zellen/mm².

In der Abbildung 23 ist das Ergebnis des gemischten linearen Modells visualisiert. Jeder Kombination von ECD1 und Kulturdauer ist ein vorhergesagter Wert von ECD2 zugeordnet. Die Farben der Heatmap entsprechen dem vorhergesagten Wert der ECD2. Die eingezeichnete Gerade markiert die Grenze zwischen vorhergesagten Werten über bzw. unter 2000 Zellen/mm². Die Werte oberhalb der Geraden entsprechen vorhergesagten Werten von \geq 2000 Zellen/mm².

Aus Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass der Zusammenhang zwischen ECD1 und Kulturdauer in Bezug auf ihren Einfluss auf die ECD2 idealisiert wäre, wenn die Kombination von Kulturdauer und ECD1 oberhalb der eingezeichneten Geraden läge – daraus erklärt sich auch der Vorhersagewert der ECD2 von über 2000 Zellen/mm². Zudem ist der schwache Effekt der Kulturdauer zu ersehen, indem die Wahrscheinlichkeit, dass ECD2 je höher die ECD1 hoch ist, sich mit einer längeren Kulturdauer immer verringert (Steigerung der eingezeichneten Geraden pro Kulturdauer in Tagen sowie die Grenze zwischen der Farbengruppen).

6. Diskussion

Die Hauptfrage dieser Studie bestand darin, zu ergründen, welche Spender- und präoperativen Eigenschaften einen Einfluss auf die ECD und ihre Entwicklung während der Kultivierung der Spenderhornhäute haben.

In der vorliegenden Studie konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bestimmte Spender- und präoperative Eigenschaften die Qualität der Transplantate, insbesondere die ECD nach der Hornhautentnahme, beeinflussen. Je nachdem, in welchem Verhältnis sie zueinanderstehen, haben sie einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung der ECD1 zu ECD2 während der Kultivierung und bis zur Transplantation. Die Ergebnisse dieser Studie in der univariablen Analyse zeigten, dass ein jüngeres Spenderalter, eine natürliche Linse, ein kurzes DEI und das Vorhandensein von Malignomen die ECD1 und ECD2 signifikant beeinflussen. Das Geschlecht und Sepsis hatten keinen Einfluss auf die ECD. In der multivariablen Analyse verliert allerdings das Vorhandensein von Malignomen seine Signifikanz.

Nach der Kultivierung wurde der Einfluss der Kulturdauer hinzugenommen und die Änderung der ECD2 beobachtet. Die Kulturdauer zeigte sich als einziger Faktor, der die Entwicklung von initialer zu endgültiger ECD negativ beeinflussen kann. Es konnte beobachtet werden, dass je länger die Kulturdauer ist, desto negativer die Entwicklung von initialer zu endgültiger ECD (p -Wert 0,002). Davon abgesehen ergab sich kein Faktor, der die ECD-Entwicklung positiv beeinflussen konnte. Mithilfe der Ergebnisse dieser Studie konnte das Ausmaß dieses negativen Effekts genauer bestimmen und feststellen, in welchem Bereich der ECD1 dieser Effekt am stärksten bzw. am schwächsten ist. Die Analyse ergab, dass die Entwicklung der ECD während der Kultivierung von drei unterschiedlichen Effektstärken der Kulturdauer betroffen war. Dabei zeigte sich, dass die Effektstärke der ECD1 vor der Kultivierung abhängig war.

Diese Ergebnisse und die daraus folgenden neuen Erkenntnisse ermöglichen eine bessere Organisation der täglichen Arbeit von Hornhautbanken, insbesondere beim Management der Hornhautkulturen. Die Transplantate, die eine $ECD1 < 2000$ Zellen/ mm^2 aufwiesen, waren nicht signifikant beeinträchtigt. Das Gegenteil zeigte sich bei den Transplantaten mit einer $ECD1 \geq 2000$ Zellen/ mm^2 . Es konnte beobachtet werden, dass innerhalb dieser Gruppe die Transplantate mit einer ECD1, die näher am Grenzwert von 2000 Zellen/ mm^2 ($ECD1 2000$ – 2200 Zellen/ mm^2) lagen, am stärksten negativ beeinflusst wurden. Diese Gruppe zeigte ein erhöhtes Risiko, in ihrer ECD unter den Grenzwert von 2000 Zellen/ mm^2 zu fallen, als die Gruppe mit einer $ECD1 \geq 2200$ Zellen/ mm^2 (siehe Abbildung 22). Bei der Betrachtung von ECD1 und der Kulturdauer als einzige Einflussfaktoren auf die Entwicklung der ECD2 zeigte

sich, dass ECD1 einen positiven Einfluss auf die Entwicklung hatte, während die Kulturdauer nur einen signifikanten Zusammenhang mit der negativen Entwicklung aufwies. Allerdings war der Effekt der Kulturdauer schwächer, da der positive Einfluss der ECD1 auf die Entwicklung zur ECD2 mit zunehmender Kulturdauer schwächer wurde (siehe Abbildung 23). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Einflussfaktoren auf die ECD1, ECD2 und die Entwicklung von ECD1 zu ECD2 sowie Eigenschaften der Hornhäute weiter diskutiert.

6.1 Spendereigenschaften

In diesem Unterkapitel werden die Eigenschaften der Spender und deren Einfluss auf die Endothelzelldichte und deren Entwicklung diskutiert.

6.1.1 Geschlecht

Diese Studie zeigte keinen signifikanten Effekt vom Geschlecht auf die ECD1. Das männliche Geschlecht übersteigt den weiblichen Anteil im Spenderkollektiv um 15 % (57 % vs. 43 %). In Bezug auf die Todesursache Malignom oder Sepsis wiesen Männer höheren Prozentsatz auf als Frauen (57 % vs. 43 %), wobei Männer um 4 % häufiger an einer Sepsis erkrankten als Frauen (52 % vs. 48 %). Die männlichen Spender waren mit einem Mittelwert von 72 ± 11 Jahren im Durchschnitt jünger als die weiblichen Spender mit einem Mittelwert von 74 ± 13 Jahren. In dieser Studie war die durchschnittliche ECD zwischen dem männlichen (ECD1 2400 ± 306 Zellen/mm²) und weiblichen Geschlecht (2399 ± 319 Zellen/mm²) vergleichbar (p-Wert 0,94).

In zahlreichen Studien, die den Einfluss des Geschlechtes der Spender auf ECD untersuchten – die vorliegende eingeschlossen – konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der wichtigsten dieser Studien kurz skizziert.

In der Studie von McGlumphy et al. (21) etwa wurde im Vergleich zur vorliegenden Studie ein größeres Patientenkollektiv untersucht. Hier wurden 39.679 Spenderhornhäute von insgesamt 20.858 Einzelspendern in die Analyse eingeschlossen. Die Kohorte bestand aus 23.355 Proben von männlichen Spendern (59 %) und 16.324 Proben von weiblichen Spendern (41 %). Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und ECD (p-Wert 0,6) nachgewiesen werden.

Andere Ergebnisse erbrachte die Studie von Kramp et al. (22). Hier wurden zwischen 2006 und 2016 4140 Hornhäute von insgesamt 2083 Spendern analysiert. Die untersuchten Einflussfaktoren umfassten unter anderem Alter, Geschlecht und Anamnese der Spender

sowie das DEI. In einem multiplen Regressionsmodell wurden die Einflussfaktoren auf die Eignung von Spendergewebe analysiert. Analog zu den Kriterien der vorliegenden Studie für optische und nicht-optische Hornhauttransplantate wurden alle Hornhäute, die nicht für eine elektive Keratoplastik in Frage kamen, als ungeeignet betrachtet. Hornhäute mit einer Endothelzellzahl von über 2000 Zellen/mm² oder solche ohne signifikante Anomalien der Endothelzellmorphologie und ohne signifikante Stromavernarbung wurden als uneingeschränkt geeignet eingestuft. Männliche Hornhäute waren aufgrund von niedriger ECD und Zellenmorphologie signifikant weniger geeignet als weibliche Hornhäute ($p = 0,028$). Auch in dieser Studie zeigte sich eine ähnliche Geschlechtsverteilung der Spender: 56,8 % männliche standen 43,2 % weiblichen Spendern gegenüber.

In der Studie von Gupta et al. (23) wurden für jede Spenderhornhaut die mittlere ECD und die Standardabweichung der mittleren Zellfläche als Indikatoren für die quantitative Analyse verwendet, während die Zellmorphologie durch den Varianzoeffizienten (CV) und den Prozentsatz hexagonaler Zellen angegeben wurde. ECD, Hexagonalität und CV wurden dann in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht des Spenders sowie vom Linsenstatus des Spenderauges analysiert.

Die Endothelzellanalyse wurde an 100 Spenderhornhäuten durchgeführt und ergab signifikante Unterschiede in der ECD zwischen männlichen und weiblichen Spenderhornhäuten. Die Daten wurden mit gepaarten und ungepaarten t-Tests analysiert, p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Männliche Spender waren mit 66 % stärker vertreten als weibliche Spender mit 34 %. Das Alter der Spender wurde anders als in dieser Studie in die Altersgruppen unter 20 Jahren und über 80 Jahren sowie zwischen 20 und 80 Jahren in Dekaden in insgesamt 8 Altersstufen eingeteilt. Die ECD der männlichen Spender lag höher ($2757 \pm 429,55 \text{ mm}^2$) als die der weiblichen Spender ($2659,66 \pm 429,55 \text{ mm}^2$). ECD, CV und Hexagonalität unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Geschlechtern in den verschiedenen Altersstufen.

Die Studie von Orski et al. (24) erbrachte ähnliche Ergebnisse wie diese Studie. Die Verteilung des weiblichen Geschlechts innerhalb des Patientenkollektivs war hier jedoch höher als bei dieser Studie. Außerdem wurde der Effekt des Geschlechts nach der Transplantation weiter untersucht. Es wurden 365 Patienten, davon 114 Männer (31,2 %) und 251 Frauen (68,8 %) eingeschlossen, und der Einfluss des Geschlechts auf die ECD wurde sowohl präoperativ als auch 4 Wochen postoperativ nach Phakoemulsifikation untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten festgestellt werden ($p\text{-Wert} > 0,05$).

6.1.2 Spenderalter

Das Spenderalter wurde in dieser Studie als signifikanter Einflussfaktor auf die ECD1 nachgewiesen. Im Spenderkollektiv dieser Studie wurde die ECD um 4 Zellen/mm² pro Jahr des Spenderalters (p-Wert < 0,001) verringert. Das Spenderkollektiv dieser konnte ein breites Spektrum von Altersgruppen erfasst werden. Das Spenderalter reichte von 17 Jahren bis zu 103 Jahren. Dieser Effekt konnte auch in anderen Studien mit unterschiedlichen Größen von Spenderpatientenkollektiven nachgewiesen werden.

Beuschel et al. (13) untersuchten, ob es mit zunehmendem Spenderalter eine lineare Abnahme der ECD gibt. Das Durchschnittsalter der Spender lag bei 41,2 ± 16,6 Jahren und war damit deutlich niedriger als im Spenderkollektiv dieser Studie (73,25 ± 12,79). Die Einteilung erfolgte in Altersstufen von unter 20 Jahre, über 60 Jahre und zwischen den 20- und 60-Jährigen jeweils in Dekaden. Die Altersspanne variierte ebenfalls. Die jüngste Person war 5 Jahre, die älteste 84 Jahre alt. Wie auch in dieser Studie zeigte sich hier eine lineare Regression, eine Abnahme der ECD mit zunehmendem Alter des Spenders. Die Untersuchung der ECD mittels Endothelzellmikroskopie bei 191 gesunden Probanden ergab einen jährlichen Verlust von 7,58 ± 0,97 Zellen/mm² pro Jahr, bei einem p-Wert von 0,001. Dieser Verlust ist größer als der in dieser Studie ermittelte Verlust von -5,56 Zellen/mm² pro Jahr, mit p-Wert < 0,001. Ab einem Alter von 35 Jahren zeigte sich bei der linearen Darstellung ein Cut-off, sodass die ursprüngliche lineare Darstellung des Effekts von Spenderalter auf Endothelzellichte in zwei Prozesse aufgeteilt wurde. Hier zeigte sich eine signifikante Regression im ersten Teil der linearen Darstellung bis zum 38. Lebensjahr (p-Wert < 0,001), während der zweite Teil ab dem 38. Lebensjahr nicht signifikant war (p-Wert 0,462) (13).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen diesbezüglich andere Resultate. Das Spenderalter wurde ebenfalls in Dekaden eingeteilt, jedoch in nur sechs Altersstufen, beginnend mit der ersten Altersstufe: unter 50 Jahre und dann weiter in Dekaden aufgeteilt bis zur letzten Altersstufe: über 90 Jahre. Mittels t-Test konnten unterschiedliche Mittelwerte der ECD1 nachgewiesen werden. Zwischen der ersten und der sechsten Altersstufe ergab sich ein Unterschied der ECD1 von ca. 200 Zellen/mm², es wurde jedoch kein Cut-off in einem bestimmten Alter beobachtet. Dieser Unterschied in den Ergebnissen könnte auf den Unterschied zwischen den Altersspannen innerhalb der Patientenpopulationen zurückzuführen sein, siehe Tabelle 5 in Unterkapitel (Zusammenhang zwischen ECD1 und Alter).

In einer in-vitro-Studie von Miyata et al. (25) konnte der negative Effekt vom Spenderalter auf die ECD gezeigt werden. Das Alter der Spender lag zwischen 2 und 75 Jahren. Die Hornhautendothelzellen wurden aus den verbleibenden Hornhaut-Korneal-Rändern von sieben menschlichen Hornhäuten gewonnen, die für eine perforierende Keratoplastik verwendet wurden. Primärkulturen wurden aus Explantaten der Endothelzellschicht,

einschließlich der Descemet-Membran, hergestellt und auf Kulturschalen vermehrt, die mit extrazellulärer Hornhautendothelmatrix vom Rind beschichtet waren. Bei der vierten Passage wurde die Häufigkeitsverteilung der Zellfläche in der konfluenten Monoschicht berechnet und die Auswirkung des Spenderalters auf die Zellfläche analysiert. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Zellmorphologie von kultivierten Hornhautendothelzellen bei Spendern unterschiedlichen Alters. Die Population unregelmäßig geformter Zellen mit sehr großer Fläche nahm mit zunehmendem Alter der Spender zu. Die Anzahl der Zellen über $2000 \mu\text{m}^2$ stieg von 6,1 % bei dem 2-jährigen Spender im Vergleich auf 27,7 % bei dem 75-jährigen Spender. Der Prozentsatz der Zellen über $2000 \mu\text{m}^2$ stieg mit zunehmendem Alter des Spenders deutlich an ($r = 0,935$, p-Wert 0,0007).

In der Studie von Uphoff et al. (26) mit einem wesentlich kleineren Patientenkollektiv von 177 Patienten wurde die ECD präoperativ sowie 2 Jahre postoperativ untersucht und das Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der gemessenen Endothelzelldichte nach 2 Jahren postoperativ in 4 Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: bis 1.000 Zellen/ mm^2 , Gruppe 2: 1000–1.500 Zellen/ mm^2 , Gruppe 3: 1500–2.000 Zellen/ mm^2 , Gruppe 4: mehr als 2.000 Zellen/ mm^2). Der Einfluss des Spenderalters auf die ECD wurde präoperativ und über einen Zeitraum von zwei Jahren nach perforierender Keratoplastik innerhalb der vier genannten Gruppen untersucht. Durch lineare Regression wurde festgestellt, dass der höchste postoperative Endothelzellverlust bei dem höchsten durchschnittlichen Spenderalter auftrat. In dieser Gruppe wurde auch die niedrigste präoperative ECD beobachtet (präoperative ECD: 2406 ± 272 Zellen/ mm^2 , postoperative ECD: 777 ± 155 Zellen/ mm^2). Das mittlere Alter der Spender war mit $50,6 \pm 17,2$ Jahren deutlich geringer als in dieser Studie, in der es $73,0 \pm 12,7$ Jahre betrug.

In der Studie von Gupta et al. (23) wurde die Endothelzellanalyse retrospektiv an 100 Spenderhornhäuten durchgeführt. Das Alter der Spender wurde wie in dieser Studie in Altersstufen eingeteilt, jedoch abweichend in insgesamt acht Altersstufen (unter 20 Jahre und über 80 Jahre sowie zwischen 20 und 80 Jahren in Dekaden). Das Durchschnittsalter der Spender war mit $63,53 \pm 19,92$ Jahren (Spanne 15–92 Jahre) ebenfalls niedriger als bei dieser Studie. Die meisten Spender waren zwischen 61 und 70 Jahre alt (23 %). Die mittlere ECD der Spenderhornhäute betrug $2708,93 \pm 271,52$ Zellen/ mm^2 . In der ersten Altersstufe (unter 20 Jahre) war die ECD signifikant höher als in den anderen Altersgruppen (p-Wert $< 0,05$).

In der Studie von Kramp et al. (22) wurde das Spenderalter ebenfalls in Altersstufen eingeteilt, jedoch in 4 Altersstufen mit folgenden Intervallen (unter 40 Jahre, über 80 Jahre sowie 20–40 und 40–60 Jahre) und auf qualitative Merkmale der ECD untersucht, identisch mit den Kriterien

dieser Studie für optische und nicht-optische Hornhauttransplantate (Grenzwert 2000 Zellen/mm²). Ein hohes Spenderalter über 80 Jahre erwies sich im Vergleich zur Referenzgruppe der Spender unter 40 Jahre als signifikant negativer Einflussfaktor auf die Eignung der Hornhaut für eine elektive Transplantation (ECD > 2000 Zellen/mm² oder ohne signifikante Anomalien der Endothelzellmorphologie und ohne signifikante Stromavernarbung) (p-Wert 0,001). In dieser Studie ergab sich zwischen der Altersstufe unter 50 Jahre und der Altersstufe über 90 Jahre ein Unterschied von mehr als 200 Zellen/mm², p-Wert < 0,001, siehe Tabelle 5. Im Kapitel (Zusammenhang zwischen ECD1 und Alter).

In einer Studie von Röck et al. (27) wurden 1340 Spenderhornhäute retrospektiv analysiert. Mittels logistischer Regressionsanalyse wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Transplantationseignung evaluiert. Die Qualitätsbeurteilung in der Studie basiert auf der ECD, berücksichtigt aber auch qualitative Merkmale wie ein unregelmäßiges Zellmosaik, Polymegathismus, Pleomorphismus, einen Endothelzellverlust von mehr als 20 % während der Kulturdauer und den Faltungsgrad der Descemet-Membran. Nur Spenderhornhäute mit einer ECD \geq 2000 Zellen/mm² wurden transplantiert. Anhand dieser qualitativen und quantitativen Kriterien wurden die Hornhäute als zur Transplantation geeignet oder ungeeignet beurteilt. Verworfen wurden 41 % (553/1340) der Hornhäute. Die häufigsten Gründe waren medizinische Kontraindikationen (20,2 %) und schlechte Endothelqualität (19,3 %). Das Alter der Spender beeinflusste die Eignung für eine Transplantation erheblich. Hornhäute von Spendern, die 80 Jahre und älter waren, wurden häufig aufgrund von Endothelinsuffizienz verworfen (p-Wert < 0,0001). Transplantiert wurden schließlich 1340 Hornhäute von insgesamt 670 Spendern; das Durchschnittsalter der Spender betrug 71 ± 14 Jahre. Die Varianz lag bei 16 bis 93 Jahren, ähnlich wie bei dieser Studie (durchschnittliches Spenderalter $73,0 \pm 12,7$ Jahre; Varianz 17–103 Jahre). Die mittlere ECD zu Beginn der Lagerung betrug 2238 ± 418 Zellen/mm² und lag damit unter Ergebnissen dieser Studie von 2314 ± 325 Zellen/mm², wobei sich Ergebnisse der vorliegenden Studie auf Hornhauttransplantate mit einer ECD von mindestens 1500 Zellen/mm² und mehr beziehen. Das mittlere Spenderalter und die mittlere ECD der als geeignet bzw. ungeeignet eingestuften Spender betragen 69 ± 14 bzw. 75 ± 13 Jahre (p-Wert < 0,0001) und 2404 ± 270 bzw. 1985 ± 462 Zellen/mm² (p-Wert < 0,0001). In dieser Studie betrug das mittlere Spenderalter bei den optischen Transplantaten 76 ± 10 Jahre und die mittlere ECD 2414 ± 257 Zellen/mm².

Bei den nicht-optischen Transplantaten betrug das mittlere Spenderalter 72 ± 13 Jahre und die mittlere ECD 1830 ± 119 Zellen/mm². Der Unterschied in den jeweiligen Merkmalen (Spenderalter und ECD) zwischen den beiden genannten Transplantatgruppen war signifikant mit einem p-Wert < 0,001.

Der mittlere ECD sank signifikant mit dem Alter des Spenders von 2763 ± 206 Zellen/mm² bei Hornhäuten von Spendern unter 40 Jahren auf 2020 ± 454 Zellen/mm² bei Hornhäuten von Spendern im Alter von 80 Jahren und älter (p-Wert < 0,0001). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in dieser Studie mit geringeren Verlusten beobachtet. Der mittlere ECD 2486 ± 322 Zellen/mm² in der Altersstufe unter 40 Jahren wurde auf 2255 ± 324 Zellen/mm² in der Altersstufe 80–89 Jahre (p-Wert < 0,001) und auf 2231 ± 269 Zellen/mm² in der Altersstufe über 90 Jahre (p-Wert < 0,001) gesunken.

In der Studie von Zhuang et al. (28) wurde eine retrospektive Fallserienstudie durchgeführt. Daten von 568 Spenderhornhäuten, die zwischen 2020 und 2021 von der Shandong Eye Bank erhalten wurden, wurden für die Analyse gesammelt. Das korneale Endothel der Spenderhornhäute wurde mittels kornealer Endothelmikroskopie untersucht, um unter anderem die korneale ECD zu bestimmen. Relevante Faktoren der Hornhautspender wie Geschlecht, Alter, Todesursache, Todeszeitpunkt, DEI und Konservierungsmethode wurden erfasst, um deren Einfluss auf die Qualität des Spenderhornhautendothels zu untersuchen. Anders als in dieser Studie wurde das Spenderalter in fünf Altersstufen unterteilt: 0–20 Jahre, 21–40 Jahre, 41–60 Jahre, 61–80 Jahre und über 80 Jahre. Im Gegensatz zum Mittelwert der vorliegenden Studie, der einen Wert von 51 Jahren aufweist, ist das Durchschnittsalter in der Studie von Zhuang mit 51 ± 18 Jahren als signifikant niedriger zu erachten. Die ECD der Hornhäute älterer Spender war niedriger als die der jüngeren Spender, und die Unterschiede zwischen den Altersgruppen erwiesen sich als statistisch signifikant (p-Wert < 0,001). In dieser Studie war der Unterschied ebenfalls signifikant, siehe Tabelle 5 in dem Unterkapitel (Zusammenhang zwischen ECD1 und Alter).

Neben dem nachgewiesenen Einfluss des Spenderalters auf die ECD stellt sich die Frage, wie stark dieser Effekt ist, wenn andere Einflussfaktoren berücksichtigt werden. In der Tat handelt es sich bei dem Alter des Spenders um ein Merkmal, das in jeder Studie vorhanden ist. Dabei können zahlreiche Kreuzeffekte auftreten. Zum Beispiel wurde, wie in dieser Studie, der Effekt von malignen Tumoren auf eine höhere ECD nachgewiesen. Hier stellt sich die Frage, ob dieser Effekt dadurch erklärt werden kann, dass es sich wahrscheinlich um einen altersbedingten Kreuzeffekt handelt, da er in der univariaten Analyse signifikant war, in der multivariaten Analyse im Vergleich zu anderen Faktoren jedoch nicht. Dies spricht für einen Kreuzeffekt.

Patienten mit bösartigen Tumoren sterben früher als gesunde Spender und gehen daher im Durchschnitt jünger in die Analyse ein. Der höchste Anteil von Spendern mit bösartigen Tumoren findet sich in der Altersstufe 4 (70-79 Jahre, 12,5 %), gefolgt von der Altersstufe 3 (60-69 Jahre, 9,7 %), der niedrigste in den Altersstufen 5 und 6 (5,1 % und 1,9 %). Darüber hinaus sind ältere Patienten im Vergleich zu jüngeren Spendern z. B. auch anfälliger für

Katarakt, was einen zweiten negativen Einflussfaktor auf die ECD im Sinne einer Pseudophakie darstellt. Auch hier war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant (mittleres Spenderalter in der phaken Gruppe mit eigener Linse 70 + 12 Jahre, in der pseudophaken Gruppe mit Kunstlinse 81 + 8,6 Jahre, p-Wert < 0,001).

Der Vorteil in dieser Studie ist, dass viele Einflussfaktoren auf die Endothelzelldichte einbezogen und parallel gemeinsam untersucht wurden, so dass solche Kreuzeffekte minimiert werden konnten. Auch die Altersspanne innerhalb des Spenderkollektivs könnte ein Grund für die unterschiedliche Ausprägung und Größe dieses Effekts sein.

6.1.3 Linsenstatus

Eine weitere Spendereigenschaft, die einen bedeutenden Einfluss auf die ECD hat, ist der Linsenstatus. Der negative Effekt des Linsenaustauschs auf die ECD konnte in vielen anderen Studien nachgewiesen werden. In dieser Studie reduzierte der Status der Pseudophakie im Vergleich zur Phakie als Referenz die ECD um -125 Zellen/mm² (p-Wert < 0,001). Der Mittelwert der ECD war in der Gruppe mit Pseudophakie niedriger (2190 ± 296 Zellen/mm², n = 284) im Vergleich zu dem Wert der Gruppe mit Phakie (2358 ± 320 Zellen/mm², n = 808), (p-Wert < 0,001).

In den bereits zitierten Studien von Kramp et al. (22) und Gupta et al. (23) wurde ebenfalls der Einfluss des Linsenstatus auf die ECD untersucht. In der Studie von Kramp et al. reduzierte eine vorangegangene Kataraktoperation (Aphakie, Pseudophakie; p-Wert < 0,001) die Eignung von Spenderhornhäuten signifikant. Es wurde der Unterschied zwischen Spendern mit und ohne Kataraktoperation und die Qualität der ECD anhand der Kriterien ≥ 2000 Zellen/mm² vs. < 2000 Zellen/mm² untersucht. Hornhäute der Augen nach Kataraktchirurgie wiesen in 66,7 % der Fälle < 2000 Zellen/mm² auf. In der vorliegenden Studie waren die Ergebnisse anders: Die überwiegende Anzahl der Transplantate, die nicht im Zusammenhang mit Kataraktoperation standen (insgesamt 73,9 % innerhalb des Spenderkollektivs), wiesen eine ECD ≥ 2000 Zellen/mm² auf (63,6 % von 73,9 %), während die ECD bei den übrigen 10,3 % < 2000 Zellen/mm² lag. Obwohl die Pseudophakie einen negativen Einfluss auf den absoluten Wert der ECD hatte, wiesen 19,3 % der pseudophakalen Transplantate (26,1 %) im Spenderkollektiv ebenfalls einen ECD-Wert ≥ 2000 Zellen/mm² auf, während sich bei den restlichen 6,8 % der Transplantate eine ECD < 2000 Zellen/mm² zeigte. Der Linsenstatus mit Aphakie wurde aufgrund des sehr geringen Anteils in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt und die entsprechenden Hornhauttransplantate wurden nicht berücksichtigt.

Auch in der Studie von Gupta et al. (23) war die Endothelzellzahl in 58 % der phaken Augen ($3098,66 \pm 439,55$ Zellen/mm²) signifikant höher (p-Wert < 0,05) als in 31 % der pseudophaken ($2692,4 \pm 461,38$ Zellen/mm²) und in 11,0 % des aphaken

($2322,05 \pm 348,13$ Zellen/mm²) Spendergewebes. In dieser Studie war der Anteil des Linsenstatus mit Phakie (73,9 %) gegenüber dem mit Pseudophakie (26,1 %) deutlich höher. Hinsichtlich des Einflusses des Linsenstatus auf die ECD war jedoch ein ähnlicher Effekt zwischen Phakie und Pseudophakie zu beobachten. Die mittlere ECD in der phaken Gruppe war mit 2357 ± 323 Zellen/mm² signifikant höher als die mittlere ECD in der pseudophaken Gruppe mit 2190 ± 297 Zellen/mm² (p-Wert < 0,001).

In der Studie von Sahoo et al. (29) wurde die Endothelqualität von Hornhäuten pseudophaker Spender mit gleichaltrigen phaken Spendern verglichen und untersucht. Es wurde eine retrospektive Analyse von jeweils 100 Hornhäuten von pseudophaken und phaken Augen mit einem Spenderalter von über 60 Jahren in beiden Gruppen durchgeführt. Der Grenzwert der ECD für die optische Keratoplastik lag wie in dieser Studie bei 2000 Zellen/mm². Das mittlere Alter der Spender war mit $66,9 \pm 7,3$ Jahren in der phaken Gruppe und $69,9 \pm 7,7$ Jahren in der pseudophaken Gruppe niedriger als das mittlere Spenderalter im Kollektiv dieser Studie. Die mittlere ECD betrug $2757,6 \pm 328,5$ Zellen/mm² in der phaken Gruppe und $2225,5 \pm 471,9$ Zellen/mm² in der pseudophaken Gruppe. Es wurden 69 bzw. 33 Hornhäute aus dem phaken bzw. pseudophaken Spenderpool verwendet. Der Unterschied in der ECD zwischen der phaken und der pseudophaken Spendergruppe erwies sich als statistisch signifikant (p-Wert < 0,0001). In dieser Studie mit einem höheren mittleren Spenderalter von 73 ± 12 Jahren betrug das mittlere Spenderalter in der phaken Gruppe 70 ± 12 Jahre und in der pseudophaken Gruppe $81 \pm 8,6$ Jahre. Die mittlere ECD betrug 2357 ± 323 Zellen/mm² gegenüber 2190 ± 297 Zellen/mm² in der phaken bzw. pseudophaken Gruppe (p-Wert < 0,001).

Der Einfluss verschiedener Operationstechniken bei der Kataraktoperation auf die ECD wurde ebenfalls diskutiert. Kataraktoperationen haben sich in Bezug auf die chirurgischen Techniken in den letzten Jahrzehnten stark weiterentwickelt. Sie sind weniger invasiv geworden und verursachen dadurch weniger Schäden an den Endothelzellen. In der vorliegenden Studie wurden die Operationstechniken nicht erfasst, da diese anamnestisch nicht erhoben wurden.

6.1.4 Todesursache Malignom/Sepsis

Zahlreiche wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass die Hornhaut als Indikator für verschiedene systemische Erkrankungen, darunter Störungen des Eiweiß-, Aminosäure- und Lipidstoffwechsels sowie Malignome wie das multiple Myelom, betrachtet werden kann. (30) Hierbei stellt sich die Frage, inwiefern solche systemischen Erkrankungen ihre Spuren auf dem Hornhautendothel hinterlassen. In der vorliegendem Spenderkollektiv wurde untersucht, wie die Todesursachen Malignom und Sepsis die ECD von Spendern beeinflussen. Während bösartige Erkrankungen einen verlängerten Sterbeprozess zur Folge haben, verläuft der Sterbeprozess bei einer Sepsis schneller. Das Ziel dieser Studie ist es, herauszufinden,

inwieweit diese beide Erkrankungen die Hornhautendothelzellen anhand der ECD beeinflussen.

Im Patientenkollektiv dieser Studie waren 35,88 % der Patienten an Malignomen erkrankt, während nur 15,46 % von einer Sepsis betroffen waren. Mittels t-Test wurde ein Unterschied zwischen den Mittelwerten der ECD von Spendern mit Malignomen im Vergleich zu Spendern ohne Malignom festgestellt. Der Mittelwert lag in der ersten Gruppe höher als in der zweiten Gruppe (2349 ± 294 vs. 2295 ± 338 Zellen/mm²; p-Wert = 0,008). Dieser Effekt ließ sich in Bezug auf die Todesursache Sepsis nicht nachweisen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der ECD zwischen den beiden Gruppen (2325 ± 325 Zellen/mm² vs. 2312 ± 325 Zellen/mm², p-Wert 0,63). Es stellt sich die Frage, warum kein Unterschied in der ECD zwischen Patienten mit und ohne Sepsis festgestellt werden konnte. Wie bereits erwähnt, könnte dies durch den Kreuzeffekt von Malignomen mit dem Spenderalter erklärt werden. Patienten mit malignen Tumoren haben eine verkürzte Lebenserwartung und fallen daher aufgrund ihres geringeren Spenderalters mit hohen initialen ECD vor der Kultivierung aus. Dieser Zusammenhang konnte auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Das mittlere Alter in der Gruppe mit Malignomen war deutlich geringer ($69,91 \pm 12$ Jahre) als das der Gruppe ohne maligne Erkrankungen ($74,61 \pm 12$ Jahre). Ein weiterer Punkt, der die Hypothese der vorliegenden Studie stützt, ist, dass der Effekt von Malignomen als Todesursache in der multivariablen Analyse seine Signifikanz als Einflussfaktor auf die ECD1 verliert. Zum anderem sind Malignome im Gegensatz zur Sepsis chronische Erkrankungen und können einen dauerhaften Effekt auf die Hornhaut haben, während bei einer Sepsis der Sterbeprozess schneller abläuft. In vielen Studien konnte ein Unterschied im Metabolismus der Hornhautendothelzellen, einerseits in Abhängigkeit von der Todesursache (schneller oder langsamer Sterbeprozess), andererseits abhängig vom Spenderalter, untersucht werden.

In der Studie von Vasiliauskaite et al. (31) wurde die Eignung von Hornhäuten septischer Spender für die Transplantation durch Analyse der Ausschussrate in der Augenbank und des klinischen Ergebnisses der Descemet Membran endothelial Keratoplastie (DMEK) unter Verwendung von organgezüchteten Hornhauttransplantaten von septischen gegenüber nicht-septischen Spendern untersucht. Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurden 1554 Hornhäute untersucht, von denen 456 Hornhäute (29 %) von septischen und 1072 Hornhäute (69 %) von nicht-septischen Spendern stammten [bei 26 Hornhäuten (2 %) war der Sepsis-Status unbekannt]. Das klinische Ergebnis 6 Monate nach DMEK wurde bei 82 Transplantaten (26 von septischen Spendern und 56 von nicht-septischen Spendern) untersucht. Die Ergebnisse wurden anhand der ECD, der zentralen Hornhautdicke und der postoperativen Komplikationen bestimmt. Die primäre Ausschussrate lag bei Hornhäuten septischer Spender höher als bei Hornhäuten nicht-septischer Spender (32,9 % vs. 24,5 %, p-Wert 0,001). Der Hauptgrund für den Ausschluss war die schlechte Qualität der Endothelzellen

sowohl bei septischen (13,8 %) als auch bei nicht-septischen (11,8 %) Spenderhornhäuten. Die Kontaminationsrate in der Hornhautbank für septische und nicht-septische Spenderhornhäute betrug 1,1 % bzw. 1,7 % (p-Wert 0,102). Nach DMEK war die Dichte der Spenderendothelzellen 6 Monate postoperativ zwischen Transplantaten von septischen und nicht-septischen Spendern vergleichbar (1410 ± 422 Zellen/mm² vs. 1590 ± 519 Zellen/mm², p-Wert 0,140). Zwischen den beiden Gruppen wurden keine Unterschiede in der zentralen Hornhautdicke nach 6 Monaten und in der Wiederaufblasrate festgestellt (p-Wert 0,780 bzw. p-Wert 0,396). In beiden Gruppen kam es in keinem der Fälle zu einer Transplantatabstoßung oder Endophthalmitis. Unter der Voraussetzung, dass die Protokolle für das Spenderscreening und die Spenderbeurteilung strikt eingehalten werden, scheint die Verwendung von Hornhäuten septischer Spender für die DMEK das Risiko für die Empfänger nicht zu erhöhen, was eine Erweiterung des Spenderpools für Hornhautgewebe ermöglicht.

In der Studie von Redbrake et al. (32) wurde der Metabolismus in Hornhauttransplantaten nach verschiedenen Todesursachen untersucht. Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Glukose und Laktat wurden im Stroma und Endothel von 30 menschlichen Hornhäuten gemessen. Die Hornhäute wurden nach Todesursache in vier Gruppen (Gruppe 1: plötzlicher Tod bei kardiovaskulären Erkrankungen, Gruppe 2: Malignome, Gruppe 3: Sepsis, Gruppe 4: renale Insuffizienz) und nach Alter in vier Gruppen (20–39 Jahre, 40–59 Jahre, 60–79 Jahre und über 80 Jahre) eingeteilt. Hornhäute von Spendern mit Diabetes wurden ausgeschlossen. Hornhäute von Patienten, die plötzlich verstorben waren – beispielsweise aufgrund eines Herzinfarkts – haben auch 24 Stunden nach dem Tod einen guten Stoffwechselstatus aufgewiesen. Bei Hornhäuten von Patienten mit Malignome oder Sepsis ist der Stoffwechsel heruntergefahren. Im Vergleich dazu befinden sich Hornhäute von Patienten mit Malignome in einem besseren Stoffwechselzustand als die von Spendern mit Sepsis, da sie sich an den Katabolismus angepasst haben. Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede in den ATP-Konzentrationen bei Hornhäuten von plötzlich verstorbenen Spendern und von Patienten mit Niereninsuffizienz im Vergleich zu Hornhäuten von Patienten mit Sepsis. Es konnte gezeigt werden, dass die Glukosekonzentration als Ressource für den Stoffwechsel mit dem Alter zunimmt. Die besten ATP-ADP-Verhältnisse wurden in der Gruppe der 40- bis 59-jährigen Spender gefunden, doch die Unterschiede zwischen den Altersgruppen waren statistisch nicht signifikant. Die höchsten Glukosekonzentrationen wurden in Hornhäuten von plötzlich verstorbenen Spendern festgestellt. Der Stoffwechsel in diesen Hornhäuten schien intakt zu sein, während er in den Hornhäuten von Patienten mit Krebs oder Sepsis auf dem Rückzug war. Die Hornhäute von Patienten mit Niereninsuffizienz wiesen eine mittlere Stoffwechselaktivität auf. Aufgrund der hohen Standardabweichung waren die Unterschiede bei den Glukosewerten statistisch nicht

signifikant. Die Werte für Laktat wiederum waren bei Hornhäuten von Patienten mit Krebs und Sepsis im Vergleich zu Hornhäuten von Patienten mit Niereninsuffizienz statistisch signifikant (p-Wert 0,05). Die ATP-Werte von Hornhäuten derjenigen Patienten, die plötzlich oder infolge einer Niereninsuffizienz verstarben, waren im Vergleich zu denen von Patienten mit Sepsis statistisch signifikant (p-Wert 0,05). Bei den ADP-Werten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Die besten ATP-ADP-Verhältnisse zeigten sich in der Gruppe der 40- bis 59-Jährigen, während die höchsten Glukosekonzentrationen und Glukose-Laktat-Verhältnisse in der Gruppe der 60- bis 79-jährigen Spender festgestellt wurden. Gruppe 1 (20-39 Jahre) enthält die Ergebnisse von zwei Spenderhornhäuten und Gruppe 4 (über 80 Jahre) nur eine Hornhaut. Diese beiden Gruppen waren schwierig zu interpretieren. Für keinen der Parameter konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen festgestellt werden.

In der Studie von Krohn et al. (33) wurde auch der Effekt der Todesursache auf die ECD untersucht, wobei drei Kategorien, einschließlich maligner Tumore, berücksichtigt wurden. In die Studie wurden 946 Hornhauttransplantate eingeschlossen. Die Spender wurden in drei Altersgruppen eingeteilt (Gruppe 1: unter 50 Jahre, Gruppe 2: 51–75 Jahre, Gruppe 3: über 75 Jahre). Außerdem wurde auch nach Todesursachen kategorisiert (Gruppe A: Malignom; Gruppe B: akuter Myokardinfarkt, Lungenembolie oder intrazerebrale Blutung; Gruppe C: andere Erkrankungen). Bei der Analyse der mittleren ECD in den jüngsten Altersgruppen Gruppe 1 und Gruppe 2 wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Todesursache gefunden. In der ältesten Altersgruppe (Gruppe 3) gab es jedoch einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mittleren ECD in der Gruppe mit Malignomen und in der Gruppe mit akutem Myokardinfarkt (2603 ± 342 Zellen/mm² bzw. 2729 ± 338 Zellen/mm²). Die mittlere ECD in der malignen Gruppe war signifikant niedriger als in der Gruppe mit Myokardinfarkt (p-Wert 0,0067).

6.2 Präoperative Eigenschaften

6.2.1 Death-To-Explantation-Interval (DEI)

Die Entnahme von Hornhaut muss so schnell wie möglich nach dem Tod erfolgen, vorzugsweise innerhalb von 24 Stunden, sonst eines maximalen DEI von 48 Stunden (34). Dennoch wird in verschiedenen Augenbanken für kultivierte Augenhornhäute ein Zeitraum von bis zu 72 Stunden akzeptiert, da nachgewiesen wurde, dass diese Methode geeignet ist und keinen Einfluss auf die Qualität der transplantierten Augenhornhäute hat (35). In Großbritannien wird ein DEI von bis zu 24 Stunden akzeptiert (36). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bisher keine groß angelegten Analysen durchgeführt wurden, um Standards für die maximale Zeitspanne zwischen Tod und Hornhautentnahme oder Explantation, und dass kein wissenschaftlicher Konsens diesbezüglich besteht. Es wurde nachgewiesen, dass sich eine längere DEI negativ auf die Endothelprognose auswirkt und zu einer geringeren Überlebensdauer des Transplantats führen kann, wie bei Böhringer et al. (37). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass eine DEI von mehr als 48 Stunden keinen Einfluss auf die Eignung von Hornhäuten hat, wie etwa die Studien von Armitage et al., Hofmann et al., Schön et al. und Shehab et al. zeigen konnten (20,35,36,38). In Deutschland darf das DEI maximal 72 Stunden betragen (19).

In dieser Studie konnte der negative Effekt eines langen DEI auf die initiale Endothelzelldichte nachgewiesen werden. Die Pearson-Korrelation war mit einem p-Wert von 0,001 signifikant. Zudem ergab sich in der Regressionsanalyse eine Reduktion um -3 Zellen/mm² pro Stunde DEI (p-Wert 0,001).

In den Studien von Böhringer et al. und Uphoff et al. (26,37) konnte der negative Effekt eines langen DEI auf die Entwicklung der ECD festgestellt werden. Bei einer Stichprobe von 177 Patienten nach perforierender Keratoplastik fanden Böhringer et al. einen statistisch signifikanten negativen linearen Effekt sowohl des DEI als auch des Spenderalters auf die ECD ($\beta = -0,324$; p-Wert 0,014, $\beta = -0,282$; p-Wert 0,036) (37).

Die Studie von Uphoff et al. (26) umfasste 120 Patienten. Im Zeitraum von Dezember 1991 bis Januar 1996 wurden an der Universitäts-Augenklinik Hamburg insgesamt 459 perforierende Keratoplastiken durchgeführt. Bei 120 Patienten mit einem mittleren Spenderalter von $50,6 \pm 17,2$ Jahren wurde ein 2-Jahres-Follow-up durchgeführt. Anhand der ECD, die 2 Jahre postoperativ erhoben wurde, erfolgte die Einteilung der Patienten in 4 Gruppen:

Gruppe 1: bis zu 1.000 Zellen/mm² mit präoperativer ECD von 2406 ± 272 Zellen/mm²,

Diskussion

Gruppe 2: bis zu 1.500 Zellen/mm² mit präoperativer ECD von 2508 ± 269 Zellen/mm²,

Gruppe 3: bis zu 2.000 Zellen/mm² mit präoperativer ECD von 2548 ± 265 Zellen/mm²,

Gruppe 4: mehr als 2.000 Zellen/mm² mit präoperativer ECD von 2700 ± 242 Zellen/mm².

Die Gruppen wurden hinsichtlich der Parameter DEI, Kulturdauer, präoperative ECD, Spender- und Empfängeralter untersucht und miteinander verglichen. Unterschiede wurden bei Normalverteilung mit dem t-Test und ansonsten mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft, wobei p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurde. Die höchste ECD wurde zwei Jahre nach Keratoplastik in der Gruppe der Spender gefunden, deren DEI am kürzesten war. Das kürzeste mittlere DEI (23,3 Stunden) zeigte sich in Gruppe 4, sie zeigte einen signifikanten Unterschied lediglich mit der Gruppe 2 (29,9 Stunden) mit einem p-Wert < 0,05. Das maximale DEI wurde wie in der vorliegenden Studie maximal 72 Stunden festgelegt.

In der bereits zitierten Studie von Zhuang et al. (28) erfolgte eine Einteilung der postmortem Zeiten bzw. der DEI je nach ihrer Länge in drei Intervalle eingeteilt: < 6 Stunden, 6–12 Stunden und > 12 Stunden – im Gegensatz zu der Einteilung in dieser Studie, bei der das DEI in 24 Stunden, 24–48 Stunden und 49–72 Stunden eingeteilt wurde. Das ECD war am höchsten, wenn die Hornhäute innerhalb von 6 Stunden nach dem Tod entnommen wurden, und der Unterschied war statistisch signifikant (p-Wert < 0,001). In dieser Studie ergab sich ebenfalls die höchste durchschnittliche ECD in der Gruppe mit einem DEI < 24 Stunden (ECD1 2342,53 ± 318 Zellen/mm²); und die niedrigste in der Gruppe mit einem DEI zwischen 48 und 72 Stunden (ECD1 2183,18 ± 303 Zellen/mm²), p-Wert < 0,001.

In der Studie von Schön et al. (20) wurde der negative Einfluss des DEI auf die ECD nachgewiesen. Die Studie war als retrospektive Kohortenstudie angelegt und umfasste einen Zeitraum von drei Jahren (2014–2016). Der ECD-Mittelwert war signifikant höher, je kürzer die Zeit zwischen dem Tod des Spenders und der Entnahme der Hornhaut war. Die Studie konnte bestätigen, dass eine längere DEI zu einer niedrigeren ECD führt. Bezogen auf eine mittlere DEI von 30,7 Stunden in der Kohorte beträgt diese Reduktion 224 Zellen/mm² nach dieser Zeit. Bei einem DEI zwischen 24 und 48 Stunden hatten 55,3 % der entnommenen Hornhäute eine ausreichende Qualität, und bei einem DEI zwischen 48 und 72 Stunden waren sogar 38,0 % noch gut genug, um transplantiert zu werden. Darüber hinaus belegen die Ergebnisse, dass sich die Augenhornhaut mit jeder zusätzlichen Stunde, die zwischen dem Tod des Spenders und der Entnahme der Hornhaut vergeht, um 7,3 Zellen/mm² reduziert (p-Wert < 0,001).

Ebenfalls konnte der negative Einfluss des DEI in der bereits erwähnten Studie von Röck et al. (27) nachgewiesen werden, dass ein längeres DEI (mehr als 48 Stunden) und eine längere

Kulturdauer (29–35 Tage) die Eignung für eine Transplantation beeinflussten (p-Wert 0,0007 bzw. p-Wert < 0,0001). Andere Faktoren wie das Geschlecht des Spenders erreichten nicht das 5%-Niveau der Signifikanz.

Aufgrund des großen Stichprobenumfangs von 1092 Hornhäuten und der langen DEI von maximal 72 Stunden konnte in dieser Studie der Effekt der DEI auf die ECD detailliert untersucht werden. Transplantate mit kürzerer DEI zeigten eine bessere ECD als solche mit längerer DEI. Bei einer DEI von weniger als 24 Stunden war die mittlere ECD1 2342 Zellen/mm² gegenüber 2194 Zellen/mm² bei einer DEI zwischen 48 und 72 Stunden.

In anderen Studien konnte dagegen kein Effekt des DEI auf die ECD nachgewiesen werden. Armitage et al. (36) konnten mittels linearer Regression bei 7107 Transplantaten keinen Effekt eines langen DEI auf die ECD feststellen (p-Wert 0,9). Die Begrenzung des maximalen DEI auf 24 Stunden gemäß den britischen Richtlinien könnte zu diesem Unterschied geführt haben (der mittlere DEI war hier 14,9 ± 7,2 Stunden).

In der Studie von Sampaio et al. (39) wurde ebenfalls der Zusammenhang zwischen DEI und ECD untersucht. Es wurden die Daten von 1128 Hornhäuten von insgesamt 564 Spendern erhoben. Die mittlere ECD zu Beginn der Kulturdauer betrug 2693,6 ± 411,8 Zellen/mm². Die mittlere ECD in der Studie von Sampaio et al., die als Hornhäute mit hoher Endothelzellzahl sowohl für die optische als auch für die tektonische Verwendung klassifiziert wurden, betrug 2738,1 ± 381,8 Zellen/mm² bzw. 2512,8 ± 346,6 Zellen/mm². Die mittlere ECD der Hornhäute, die als Hornhäute mit niedriger Endothelzellzahl klassifiziert wurden, betrug 1683,4 ± 256 Zellen/mm². Bezüglich der DEI betrug die mittlere DEI 6,8 ± 4,2 Stunden. Die durchschnittliche ECD der Hornhäute betrug 2731,8 ± 372,7 Zellen/mm² bei einem DEI von weniger als 6 Stunden (Referenzkontrolle), 2708,9 ± 381 Zellen/mm² bei einem DEI von 6-12 Stunden und 2728,4 ± 444,3 Zellen/mm² bei einem DEI von 12-24 Stunden. Der mittlere DEI über die gesamten 24 Stunden betrug 2723,0 ± 399 Zellen/mm². Der Zusammenhang zwischen DEI und Endothelzellverlust war zwischen den Gruppen nicht signifikant (p-Wert 0,12; p-Wert 0,44; DEI < 6 Stunden als Referenzgruppe), was sich von den Ergebnissen der vorliegenden Studie unterscheidet. Die DEI-Gruppen waren in dieser Studie ebenfalls unterschiedlich aufgeteilt (DEI < 24 Stunden, DEI 24-28 Stunden, DEI 49-72 Stunden). Die mittlere ECD der Gruppe DEI < 24 Stunden war um 2342 ± 318 Zellen/mm² kleiner als die ECD1, wenn nur die ECD1 der Gruppe (DEI < 24 Stunden) der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen von Sampaio et al. verglichen wird (p-Wert < 0,001).

Im Vergleich zu den anderen DEI-Gruppen in dieser Studie zeigte die Gruppe DEI < 24 Stunden einen signifikanten Unterschied von 159 Zellen/mm² zur mittleren ECD der Gruppe DEI > 48 Stunden (p-Wert < 0,001), während der Unterschied zur Gruppe DEI: 24-48 Stunden nur 29 Zellen/mm² betrug. Der Unterschied war nicht signifikant (p-Wert 0,176).

6.2.2 Kulturdauer

Nach den deutschen Richtlinien darf die Kulturdauer maximal 34 Tage betragen (19). In dieser Studie lag die längste Kulturdauer bei 28 Tagen, die kürzeste bei 7 Tagen. Der Mittelwert betrug $11,1 \pm 3,9$ Tage.

In dieser Studie konnte der negative Einfluss einer längeren Kulturdauer auf die ECD2 beobachtet werden. Mittels Pearson-Korrelationskoeffizienten wurde eine signifikante Korrelation nachgewiesen, p-Wert 0,002. Zudem zeigte die Regressionsanalyse eine Reduktion der ECD um $-9,670$ Zellen/mm² pro Tag im Kulturmedium; p-Wert 0,002.

Beim Vergleich der Mittelwerte der ECD2 mittels t-Test zwischen Gruppe 4 (Kulturdauer > 21–28 Tage) und Gruppe 1 (Kulturdauer von 7 Tagen) zeigte sich ein signifikanter Unterschied von ca. 200 Zellen/mm². Die ECD2 betrug in der Gruppe 4 2244 ± 317 Zellen/mm², während sie in Gruppe 1 bei 2410 ± 276 Zellen/mm² lag.

Zhu et al. (40) haben die Entwicklung der Endothelzellen auf Zellkulturplatten untersucht. Die transversalen Hornhautschnitte von jüngeren und älteren Spendern wiesen ein Proliferationspotenzial in der Kultivierungsphase auf. Die Endothelzellen der jüngeren Spender konnten im Vergleich zu älteren Spendern in der Kultivierungsphase besser auf die Wachstumsfaktoren ansprechen. Faktoren wie das DEI und der Linsenstatus wurden nicht berücksichtigt.

Die vorliegende Studie hat in ihrer multivariaten Analyse ergeben, dass der negative Einfluss der Kulturdauer auf den Absolutwert der ECD2 neben den signifikanten negativen Effekten eines hohen Spenderalters, einer Pseudophakie und eines langen DEI (jeweils p-Wert < 0,001, < 0,001, < 0,001) bestehen blieb. Der Einfluss der Kulturdauer war jedoch weniger signifikant (p-Wert: 0,003). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Entwicklung der ECD1 zur ECD2, dass die Kulturdauer der einzige Faktor war, der diese beeinflusste. Es war erkennbar, dass eine längere Kulturdauer mit einer negativeren Entwicklung der ECD während der Kultivierung einherging (p-Wert: 0,002).

In der Studie von Thuret et al. (41) wurden 56 Hornhäute (28 Paare) untersucht, die zwischen 0 (herzschlagende Spender) und 27 Stunden nach dem Tod entnommen wurden. Der mittlere Wert des DEI war mit 10 ± 8 Stunden niedriger als der mittlere DEI in dieser Studie mit 27 ± 15 Stunden. 19 der 28 Hornhautpaare stammten von Spendern ohne Herzschlag. Das Durchschnittsalter der Spender betrug $48,1 \pm 20,4$ Jahre kleiner als dem durchschnittlichen Spenderalter in dieser Studie mit 73 ± 12 Jahre. Es wurde eine prospektive Doppel-Blind-Vergleichsstudie durchgeführt, bei der die Kulturdauer der gepaarten Hornhäute und ihre Zuordnung zu den Empfängern randomisiert wurden. Wenn ein Hornhautpaar in einer der beiden Banken eintraf, wurde die Kulturdauer nach dem Zufallsprinzip zugewiesen. Eine

Hornhaut eines jeweiligen Hornhautpaares wurde zwischen 5 und 12 Tagen kultiviert (Kurzzeitkultivierung), die andere zwischen 21 und 35 Tagen (Langzeitkultivierung). Da ein Zellverlust bei längerer Organkultur unvermeidlich ist, wurden die Hornhautpaare nur dann aufgenommen, wenn die anfängliche ECD jeder Hornhaut größer als 2400 Zellen/mm² war. Für jede Hornhaut wurden einerseits der prozentuale Anteil des gesamten Endothelzellverlusts während der Lagerung gezählt, der $100 \times (\text{anfängliche ECD} - \text{endgültige ECD}) / \text{anfängliche ECD}$ entspricht, und andererseits der prozentuale tägliche Endothelzellverlust, der dem prozentualen Gesamtverlust an Endothelzellen dividiert durch die Anzahl der Tage der Organkultur entspricht. Die ECDs in beiden Gruppen waren zu Beginn der Organkultur vergleichbar. Die Hornhäute der Gruppe 2, deren mittlere Kulturdauer $25,3 \pm 4,7$ Tage betrug, verloren mehr Endothelzellen ($16,2 \% \pm 5,2 \%$) als die der Gruppe 1 ($6,4 \% \pm 4,8 \%$, p-Wert 0,001), deren mittlere Kulturdauer $9,1 \pm 1,9$ Tage betrug. Bei der Entnahme der Hornhaut führte dies in Gruppe 1 zu einer um 273 Zellen/mm² höheren ECD von insgesamt 2551 Zellen/mm², was 10,7 % zusätzlicher Zellen entspricht. In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Unterschied von 194 Zellen/mm² zwischen den mittleren ECD2 in der Gruppe 1 mit einer Kulturdauer von 7 Tagen und der Gruppe 4 mit einer Kulturdauer von 22 bis 28 Tagen festgestellt (ECD2 in der Gruppe 1: 2414 ± 283 Zellen/mm², ECD2 in der Gruppe 4: 2220 ± 336 Zellen/mm², p-Wert < 0,001). In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die Kulturdauer abweichend von der Einteilung in der vorliegenden Studie, in zwei Gruppen unterteilt wurde: Gruppe 1 umfasst Zeiträume von bis zu 12 Tagen (5–12 Tage) und Gruppe 2 Zeiträume von mehr als 21 Tagen (21–24 Tage) in Organkultur. In dieser Studie wurde die Kulturdauer in vier Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: 7 Tage, Gruppe 2: 8–14 Tage, Gruppe 3: 15–21 Tage, Gruppe 4: 22–28 Tage).

In der Studie von de Mora (42) wurden die klinischen Ergebnisse der ersten 500 konsekutiven DMEK-Operation am Niederländischen Institut für Innovative Ocular Surgery (NIIOS) in Rotterdam bewertet und die klinischen Ergebnisse derselben Kohorte mit den Spender- und Gewebedaten in der Augenbank (Amnitrans EyeBank, Rotterdam, Niederlande) abgeglichen und statistisch ausgewertet. In dieser Studie schienen verschiedene Ergebnisparameter nicht mit dem Schwierigkeitsgrad der Operation oder dem Fehler bei der Präparationsfehler zu korrelieren. So zeigten einige Augen eine Abnahme der ECD, die nicht auf ein chirurgisches Trauma oder eine postoperative (teilweise) Transplantatablösung zurückgeführt werden konnte. Wenn weder die Vorbereitung noch das chirurgische Trauma noch die postoperative Transplantatablösung eine überdurchschnittliche ECD-Abnahme erklären, können Spender- und/oder empfängerbezogene Faktoren die Ergebnisse der DMEK oder deren Komplikationen beeinflussen. Das Ziel dieser Studie war es also, zu untersuchen, ob Spender- und gewebebezogene Parameter mit der kurzfristigen ECD-Reduktion und/oder der Ablösungsrate korrelieren. Das gesamte Spendergewebe wurde unter Organkulturbedingungen gelagert. Die

Abnahme der Zelldichte wurde als prozentuale Veränderung zwischen den Werten vor dem Eingriff in der Augenbank und den Werten bei der Nachuntersuchung nach 6 Monaten. Der Zusammenhang zwischen der Abnahme der ECD und allen Spender- und gewebebezogenen Parametern wurde gleichzeitig mit multipler linearer Regression analysiert. Nur die Kulturdauer zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit der Abnahme der ECD. Für jeden zusätzlichen Tag im Medium war die Abnahme der ECD-Entwicklung im Durchschnitt um 0,7 % angestiegen; geschätzter Koeffizient, 0,70 mit 95 %-KI:0,15;1,24; standardisierter Regressionskoeffizient, 0,15; p-Wert 0.01.

In der bereits zitierten Studie von Röck et al. (27) wurde ebenfalls der Effekt der Kulturdauer, unter anderem auf die ECD, untersucht. Es wurden jeweils beide Hornhäute desselben Spenders einbezogen und als unabhängig betrachtet. Je nach Bedarf wurden univariate Analysen und multiple Regressionen verwendet. Diese retrospektive Studie umfasste 1340 Hornhäute von insgesamt 670 Spendern. Nur Spenderhornhäute mit einer ECD \geq 2000 Zellen/mm² wurden transplantiert. Anhand dieser qualitativen und quantitativen Kriterien wurden Hornhäute entweder als zur Transplantation geeignet oder ungeeignet beurteilt (ECD \geq 2000 Zellen/mm²; ECD $<$ 2000 Zellen/mm²). Die durchschnittliche ECD zu Beginn der Kulturdauer betrug 2238 ± 418 Zellen/mm² und lag damit unter das Ergebnis dieser Studie mit durchschnittliche ECD von 2314 ± 325 Zellen/mm².

Die durchschnittliche Kulturdauer in der Organkultur betrug $13,8 \pm 6,1$ Tage. 41,3 % der Hornhäute wurden verworfen. Ein längeres DEI (von mehr als 48 Stunden) und eine längere Kulturdauer (29–35 Tage) hatten Einfluss auf die Eignung für eine Transplantation (p-Wert = 0,0007 bzw. p-Wert $<$ 0,0001). Andere Faktoren wie das Geschlecht des Spenders erreichten nicht das Signifikanzniveau von 5 %. In dieser Studie lag die mittlere Kulturdauer bei $11 \pm 3,9$ Tagen. Die ECD₂ nach der Kultivierung war in der Gruppe mit einer Kulturdauer von 7 Tagen bei 2414 ± 283 Zellen/mm² höher als die ECD₂ in der Gruppe 4 mit Kulturdauer von 21-28 Tagen mit 2220 ± 336 Zellen/mm² (p-Wert $<$ 0,001).

Schließlich stellt sich die Frage, inwieweit dieser Effekt von anderen Faktoren abhängt. Kreuzeffekte wie die Altersverteilung der Spender oder der Linsenstatus könnten z.B. einen unterschiedlichen Einfluss auf die ECD-Entwicklung zweier Hornhauttransplantate, die gleicher Kultivierungsdauer im Kulturmedium haben.

In der multivariaten Analyse dieser Studie zum Beispiel war der Effekt der Kulturdauer auf den Absolutwert der ECD₂ neben den signifikanten negativen Effekten eines hohen Spenderalters, einer Pseudophakie und eines langen DEI (jeweils p-Wert $<$ 0,001, $<$ 0,001, $<$ 0,001) bestehend, allerdings schwächer (p-Wert: 0,003). Im Gegensatz dazu zeigte sich die lange Kulturdauer bei der Entwicklung der ECD₁ zur ECD₂ als einziger Faktor, der diese beeinflusste (p-Wert: 0,002).

6.3 Initiale Endothelzelldichte (ECD1)

In den Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigte sich ein signifikanter positiver Effekt der ECD1 auf die Entwicklung der ECD2 während der Kultivierung (p-Wert: 0,001). Derselbe Zusammenhang konnte auch in der multiplen linearen Regression nachgewiesen werden, bei der die Kulturdauer als zweiter Einflussfaktor berücksichtigt wurde.

In der Studie von Culberston et al. (43) wurden Spenderhornhäute von 68 Patienten, die sich einer perforierenden Keratoplastik unterzogen hatten, vor der Operation und drei Monate nach der Operation mit dem Endothel-Spiegelmikroskop fotografiert. 43 dieser Patienten kamen ein Jahr nach der Operation für weitere Aufnahmen zurück. Da das Ziel darin bestand, Patienten mit unkompliziertem postoperativem Verlauf zu beobachten, wurden zwei Patienten mit anhaltend erhöhtem Augeninnendruck (über 22 mm Hg) und zwei Patienten mit dokumentierten Abstoßungsreaktionen auf das Transplantat ausgeschlossen. Diese Hornhäute von 39 Patienten hatten nach drei Monaten 18,3 % ihrer ursprünglichen Zellen verloren und erlitten bis zum Ende des Jahres einen weiteren Zellverlust von 15,3 % (der Gesamtverlust nach einem Jahr betrug 33,6 %). Werden die 25 zusätzlichen Patienten mit einbezogen, die nur drei Monate lang beobachtet wurden, beträgt der berechnete Zellverlust nach drei Monaten 19,6 %, was der kleineren Gruppe von 39 Patienten entspricht, und die präoperative ECD betrug im Mittel 2611 Zellen/mm². Nach drei Monaten waren es durchschnittlich 2.148 Zellen/mm² (Bereich: 650–3.300 Zellen/mm²) und nach einem Jahr 1.740 Zellen/mm² (Bereich: 550–2.800 Zellen/mm²). Generell galt: Je höher die Zellzahl vor der Operation, desto höher war sie sowohl drei als auch zwölf Monate nach der Operation (p-Wert < 0,001).

In der Studie von Wakefield et al. (44) konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie kein Effekt der präoperativen ECD auf die Entwicklung der ECD oder das Transplantatüberleben nachgewiesen werden. Es wurden prä- und postoperative Daten von perforierenden Keratoplastiken analysiert, die zwischen April 1999 und März 2012 im Vereinigten Königreich durchgeführt wurden. Die Indikationen für eine Hornhauttransplantation wurden nach Diagnose gruppiert; Fuchs-Endotheldystrophie (FED) und pseudophake bullöse Keratopathie (PBK) wurden mit allen anderen Indikationen zusammengefasst. Andere Dystrophien, aphake bullöse Keratopathie, Infektionen, Verletzungen und Trübungen sind die Hauptindikationen für eine Transplantation, die unter „alle anderen Indikationen“ zusammengefasst werden. Abgesehen von Keratokonus gab es keine weiteren Ausschlüsse aus der Studie aufgrund der Indikation. Das Spenderalter wurde in drei Gruppen (0–60 Jahre, 61–75 Jahre und über 75 Jahre) eingeteilt, ebenso wie die ECD

der Spender (≤ 2400 Zellen/mm², 2401–2600 Zellen/mm² und > 2600 Zellen/mm²). Mithilfe der Cox-Proportional-Hazards-Regression wurde untersucht, ob die ausgewählten Untergruppen des Spenderalters und der Spender-ECD einen Einfluss auf die Endothelinsuffizienz haben, und es wurde eine systematische Analyse der Interaktion zwischen Spender-ECD und Spenderalter durchgeführt.

Die Analyse wurde nach der erwähnten Hornhautdiagnose stratifiziert und für potenziell störende Faktoren korrigiert (Übereinstimmung der humanen Leukozyten-Antigene; Durchmesser der Spendertrepanation; tiefe Vaskularisation; Auftreten reversibler Abstoßungsreaktionen und Einnahme von systemischen antiviralen Medikamenten, Langzeitsteroiden oder anderen Immunsuppressiva). Insgesamt wurden 9415 Patienten aus der National Health Service Blood and Transplant UK Transplant Registry eingeschlossen, die sich erstmals einer perforierenden Keratoplastik aus optischen Gründen unterzogen hatten. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Transplantats aufgrund von Endothelerkrankungen betrug bei FED 95 % (95 % KI: 93 %; 96 %), bei PBK 83 % (95 % KI: 80 %; 85 %) und bei allen anderen Indikationen 89 % (95 % KI: 87 %; 91 %). Die 5-Jahres-Überlebensrate des Transplantats aufgrund von Endothelerkrankungen betrug insgesamt 89 % (95 % KI 88 % bis 90 %). Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die Drei-Wege-Interaktion zwischen Spender-ECD, Spenderalter und Indikation nicht signifikant war (p-Wert 0,91), nachdem sie um die bereits erwähnten potenziellen störenden Faktoren bereinigt wurde. Das bedeutet, dass die Interaktion zwischen Spender-ECD und Spenderalter nicht für jede Indikation ein signifikant unterschiedliches Muster aufwies. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass eine wechselseitige Interaktion zwischen Spender-ECD und Spenderalter nicht signifikant war ($p = 0,88$), weshalb sich die Schlussfolgerung aufdrängte, dass die Auswirkung der Spender-ECD auf das Transplantatüberleben aufgrund eines Endotheldefekts nicht vom Spenderalter abhing. In weiteren Analysen zeigten sich weder die Interaktion zwischen Indikation und Spenderalter noch die Interaktion zwischen Indikation und Spender-ECD signifikant (p-Wert 0,4 bzw. 0,6). Das bedeutet, dass es keine Hinweise darauf gab, dass sich die Auswirkungen des Spenderalters und der Spender-ECD auf das Transplantatüberleben aufgrund von Endotheldefekten zwischen den Indikationen für die Transplantation unterscheiden. Schließlich waren die Haupteffekte der Spender-ECD und des Spenderalters nicht signifikant (p-Wert 0,2 bzw. 0,6). Nach Anpassung an die ausgewählten Störfaktoren waren die Haupteffekte der Spender-ECD und des Spenderalters nicht signifikant.

Diese Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Studie können auf die unterschiedliche Einteilung der ECD-Gruppen sowie der Altersgruppen zurückgeführt werden. Außerdem wurden hier viele Kreuzeffekte wie das DEI und der Linsenstatus, die in dieser Studie einen signifikanten Zusammenhang mit der ECD1 aufweisen, nicht berücksichtigt. Darüber hinaus

untersuchten Wakefield et al. die ECD auch nach der Transplantation, während dieser Studie bloß den Zeitraum bis zur Transplantation berücksichtigt.

In der bereits zitierten Studie von Uphoff et al. (26) zeigte sich 2 Jahre nach perforierender Keratoplastik ebenfalls noch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der präoperativen und der postoperativen ECD. Es zeigte sich, dass Gruppe 1 (geringste ECD nach 2 Jahren) auch präoperativ die geringste mittlere ECD aufwies. Sie betrug 2.406 ± 272 Zellen/mm². In Gruppe 4 wurde präoperativ eine Zelldichte von 2.700 ± 242 Zellen/mm² gefunden, sodass hier eine um durchschnittlich 12,3 % höhere Zelldichte im Vergleich zu Gruppe 1 vorlag. Der Unterschied erwies sich mit p-Wert < 0,001 als statistisch signifikant. Auch im Vergleich zu den Gruppen 2 und 3 war die ECD signifikant höher.

In der Studie von Shehab et al. (38) wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 mit einem ähnlichen Studiendesign wie in der vorliegenden Studie nachgewiesen. Es wurde eine registerbasierte Analyse von Hornhäuten, die zwischen Januar 2011 und Januar 2017 gespendeten wurden, durchgeführt. Die Spenderhornhäute wurden aus dem dänischen Hornhautbankregister identifiziert; die Krankenakten der Spender wurden bezüglich fehlender Informationen ausgewertet.

Insgesamt wurden 2788 Hornhäute in diese Studie aufgenommen; für 2193 Hornhäute lagen am Ende der Kultivierung vollständige Daten vor – ein ungleich größeres Spenderkollektiv als das vorliegende Spenderkollektiv. Die Eignung eines Transplantats wurde definiert als ECD über 2000 Zellen/mm², gemessen sowohl zum Zeitpunkt der Kultivierung, abgekürzt als ECD-P (Ähnlich zu ECD1 vor der Kultivierung in der vorliegenden Studie) als auch am Ende der Kultivierung, vor Freigabe des Gewebes (abgekürzt als ECD-R, ähnlich zur ECD2 in der vorliegenden Studie). Ob ein Transplantat erfolgreich in einen Empfänger transplantiert werden konnte, wurde nicht bewertet, da chirurgische Technik und Fehler einen Einfluss darauf haben können, ob eine Keratoplastik im Laufe der Zeit als erfolgreich zu bewerten ist. Es wurde nur beurteilt, ob das gespendete Gewebe als brauchbar angesehen wurde, jedoch nicht, ob die Transplantation letztlich erfolgreich war.

Untersucht wurde der Einfluss folgender Faktoren: Geschlecht des Spenders, Alter des Spenders, und DEI auf ECD-P. Der Einfluss der oben genannten Variablen sowie der Kulturdauer wurde weiterhin in Hinblick auf die ECD-R analysiert. Das Alter der Spender wurde ähnlich zur vorliegenden Studie in sechs Stufen unterteilt (≤ 50 Jahre, 51–60 Jahre, 61–70 Jahre, 71–80 Jahre, 81–90 Jahre, ≥ 91 Jahre). Das DEI wurde anders als in dieser Studie in 12-Stunden-Intervalle und in insgesamt 6 Gruppen unterteilt (< 12 Jahre, 12–24 Jahre, 24–36 Jahre, 36–48 Jahre, 48–60 Jahre, > 60 Jahre). Die Kulturdauer wurde ebenfalls anders mit längeren Intervallen aufgeteilt (Kulturdauer: < 28 Tage, 28–49 Tage, > 49 Tage). Es wurde eine logistische Regression durchgeführt, um festzustellen, ob das Alter des Spenders, das

DEI und die Kulturdauer auf die ECD-P und ECD-R beeinflussen, die einer für Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, abgekürzt als DSAEK und DMEK oder perforierende Keratoplastik verwendbaren Spenderhornhaut entsprechen. ECD-P und ECD-R wurden wie in dieser Studie als kategorische Variablen klassifiziert (über oder unter 2000 Zellen/mm²), und die anderen oben erwähnten Variablen waren in dieser Analyse kontinuierlich. Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden log-transformiert. Dies war beim DEI der Fall.

Schließlich wurde eine logistische Regression durchgeführt, um festzustellen, ob die oben genannten Variablen einen Einfluss darauf hatten, welche Hornhäute fehlende Werte aufwiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass ein höheres Spenderalter einen negativen Einfluss auf die ECD-P hat. Insgesamt wiesen 96,4 % (186 von 193) der Hornhäute von Spendern unter 50 Jahren eine ECD-P von mehr als 2000 Zellen/mm² auf und wurden damit zunächst als für DSAEK/DMEK oder PK geeignet eingestuft, während nur 62,1 % (77 von 124) der Hornhäute von Spendern über 90 Jahren als geeignet eingestuft wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Hornhaut für eine DSAEK/DMEK oder PK geeignet war, nahm mit zunehmendem Alter des Spenders mit einem p-Wert < 0,001 ab.

Die logistische Regression für die ECD-P zeigte einen signifikanten negativen Effekt des Spenderalters (OR: 1,07, 95%CI: 1,05;1,08, p-Wert < 0,001) auf die Eignung. Demnach steigt das Risiko, dass eine Spenderhornhaut die ECD-Anforderung von > 2000 Zellen/mm² nicht erfüllt, um 7 % pro Jahr höheren Spenderalters. In die Ergebnisse der vorliegenden Studie nahm die ECD1 im Zusammenhang mit Spenderalter um -5,558 Zellen/mm² pro Jahr höheren Spenderalters (p-Wert < 0,001). Die logistische Regression und der Chi-Quadrat-Test ergaben wie in dieser Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Hornhäuten von männlichen und weiblichen Spendern (p-Wert 0,547). Ebenso hatte das DEI im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie in der logistischen Regressionsanalyse keinen signifikanten Einfluss auf die ECD-P (p-Wert 0.501).

Die ECD-P beeinflusste signifikant, ob eine Hornhaut nach der Kultivierung für DSAEK/DMEK verwendbar ist (p-Wert < 0,001). Von den Hornhäuten mit einer ECD1 zwischen 2000 und 2500 Zellen/mm² waren 92,9 % geeignet, während alle Hornhäute (100 %) mit einer ECD1 von > 3000 Zellen/mm² geeignet waren. Die Korrelation zwischen ECD1 und ECD2 war wie das Ergebnis dieser Studie signifikant (Korrelationskoeffizient = 0,69, p-Wert < 0,001).

Die ECD-P hatte auch einen signifikanten Effekt in der logistischen Regressionsanalyse (OR: 1,008, 95 % KI: 1,003; 1,013, p-Wert 0,001). Eine Hornhaut mit einer ECD1 von 3.000 Zellen/mm² bei der Kultivierung hätte daher eine etwa 53-mal höhere Wahrscheinlichkeit, für eine DSAEK/DMEK oder PK verwendet werden zu können, als eine Hornhaut mit einer anfänglichen ECD-P-Messung von 2.500 Zellen/mm².

6.4 Änderung der Endothelzellichte

Eine der zentralen Fragestellungen dieser Studie ist, wie sich die Hornhautendothelzellen während der Kultivierungsphase in der Hornhautbank entwickeln, und ob der Grenzwert für optische Transplantate ($ECD2 \geq 2000$ Zellen/ mm^2) erreicht, überschritten oder unterschritten wird. Besonders interessant ist dabei, welche Faktoren bei einigen Transplantaten eine positive Entwicklung fördern, während sie bei anderen eher negativen Auswirkungen haben. Die Kulturdauer erwies sich im Vergleich zu den Spender- und anderen präoperativen Eigenschaften wie dem DEI als einziger Faktor in der multivariaten Analyse mittels logistischer Regression der OR, der die Entwicklung der ECD1 zur ECD2 negativ beeinflusste. Wurden die Kulturdauer und der ECD1-Wert als einzige Einflussfaktoren auf die Entwicklung betrachtet, zeigte sich jedoch, dass der ECD1-Wert der stärkste Faktor war, der einen positiven Effekt auf die Entwicklung hatte. Der Einfluss der Kulturdauer auf die Entwicklung der Transplantate variierte in Abhängigkeit von der initialen ECD. Bei Transplantaten mit einer niedrigen $ECD1 < 2000$ Zellen/ mm^2 zeigte sich kein signifikanter Effekt der Kulturdauer. Transplantate mit einer ECD1 mit 2000-2200 Zellen/ mm^2 wiesen jedoch ab dem 16. Kulturtag ein doppelt so hohes Risiko auf, ihre ECD auf unter 2000 Zellen/ mm^2 zu senken (Anstieg der OR von 10 % auf 20 %, siehe Abbildung 22). Interessanterweise stammen diese Transplantate überwiegend von älteren Spendern. Transplantate mit einer $ECD1 \geq 2200$ Zellen/ mm^2 zeigten sich hingegen resistenter, selbst bei längerer Kulturdauer, und behielten in der Regel eine $ECD1 \geq 2000$ Zellen/ mm^2 .

Gleichzeitig bewirkte eine längere Kulturdauer eine Abschwächung der Wahrscheinlichkeit, dass die ECD2 hoch ausfiel, insbesondere bei höheren ECD1-Werten. Obwohl der ECD1-Wert grundsätzlich einen positiven Einfluss auf die Entwicklung hatte, nahm dieser positive Effekt mit zunehmender Kulturdauer allmählich ab (siehe Abbildung 23). Diese Hornhauttransplantate stammen meistens von jüngeren Spendern.

Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Einfluss der Kulturdauer eng mit den ECD1 in den Kulturgefäßen zusammenhängt. Außerdem scheint ECD1 sowohl von biologischen als auch von mechanischen Eigenschaften beeinflusst zu werden. Das Verhältnis dieser Eigenschaften zur Kulturdauer könnte die Stärke und Ausprägung ihres Einflusses auf die Entwicklung der ECD1 zu ECD2 bestimmen, was sich in die Ergebnisse der vorliegenden Studie insbesondere bei Transplantaten mit einer $ECD1 \geq 2000$ Zellen/ mm^2 zeigt. Es ist zu vermuten, dass es hier zu einer verstärkten Zellkontakthemmung oder Konkurrenz um Wachstumsfaktoren kommen kann – wobei das Risiko für negative Konversion der ECD unter 2000 Zellen/ mm^2 bei Hornhäuten mit einer $ECD \geq 2200$ Zellen/ mm^2 schwächer ausgeprägt ist

als bei Hornhäuten mit einer ECD zwischen 2000 und 2200 Zellen/mm² (OR 10 % vs. 20 %). Wahrscheinlich wirkt die große Dichtspanne der ECD von 2200 Zellen/mm² bis zum Grenzwert von 2000 Zellen/mm², die Hornhauttransplantate ab 2200 Zellen/mm² aufweisen, als Kompensationsmechanismus bzw. als Puffer an ECD gegen die negative Konversion mit längerer Kulturzeit unter 2000 Zellen/mm².

Darüber hinaus scheint die Reifung der Zellkontakthemmung ab einer bestimmten ECD einen verstärkten negativen Faktor auf die ECD darzustellen.

In den Studien von Wulle und Lerche aus dem Jahr 1969 (45) und von Wulle aus dem Jahr 1972 (46) wurde ein Zusammenhang zwischen der Zeit, in der die potenzielle Proliferation der Endothelzellen stoppt, und der Zeit, in der die Zellkontakthemmung gebildet wird, diskutiert. Dieser Prozess wird durch den Tumor-Growth-Faktor- β 2 kontrolliert, dessen Hemmung durch die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase (p27Kip1) vermittelt wird (17). Die Konzentration dieses Proteins ist durch die Auflösung der Zellkontakthemmung mittels Ethylendiamintetraessigsäure, abgekürzt als EDTA stark reduziert (17,47). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hornhautendothelzellen unter Ausschaltung der zuvor genannten Hemmung entweder mechanisch durch Wundheilungsmodelle oder durch die EDTA wieder in der Lage sind, zu proliferieren, wenn positive Wachstumsfaktoren vorhanden sind (47).

Eine weitere Hemmung der Proliferation von Hornhautendothelzellen konnte in einer Studie von Schultz et al. 1992 (48) beobachtet werden: Es wurde festgestellt, dass Kammerwasser eine niedrige Konzentration notwendiger Wachstumsfaktoren enthält.

Außerdem konnte in weiteren Studien von Gospodarowicz et al. 1980 (49) und Blake et al. 1997 (50) bewiesen werden, dass die Wachstumsfaktoren durch die Descemet-Membran gebunden sind, sodass die Endothelzellen in vivo trotz der fehlenden dominanten Zellkontakthemmung eine eingeschränkte Fähigkeit zu Proliferation zeigen. Diese eingeschränkte Fähigkeit ist auf mangelnde Wachstumsfaktoren oder eingeschränkte Stimulation dieser Faktoren zurückzuführen.

Zum anderen sind biologische Faktoren wie ein erhöhter Anteil alter Hornhautendothelzellen in Transplantaten von älteren Spendern, die damit verbundene höhere Anfälligkeit für oxidativen Stress und Apoptose sowie ein unterschiedliches Ansprechen auf Wachstumsfaktoren, je nach Spenderalter, zu berücksichtigen.

Tatsächlich wurde eine höhere Anfälligkeit für oxidativen Stress und ein schlechteres Ansprechen auf Wachstumsfaktoren bei Hornhauttransplantaten von älteren Spendern im Vergleich zu jüngeren Spendern von Joyce et al. (51) nachgewiesen. Diese qualitativen

Eigenschaften können neben den quantitativen Eigenschaften, wie z. B. der Zellkontakthemmung, bei der Untergruppe der Hornhauttransplantate mit einer ECD von 2000–2200 Zellen/mm² zusätzliche Schäden verursachen und zu einem weiteren Verlust der ECD führen. Diese beiden Eigenschaften hängen wiederum von der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren ab, je länger die Kulturdauer ist.

Dieser negative Effekt von oxidativem Stress auf die Entwicklung von ECD1 zu ECD2 in Verbindung mit dem Spenderalter ist in die Ergebnisse der vorliegenden Studie vor allem in der Abbildung 22 bemerkbar. Werden die Hornhauttransplante mit ECD1 \geq 2000 Zellen/mm² nach dem in Abbildung 22 dargestellten Cut-off (Ab dem 16. Tag der Kultivierung wurde eine Umwandlung der Farbkodierung für das Risiko einer negativen Konversion von ECD unter 2000 Zellen/mm² von Grün zu Gelb im Bereich der ECD 2200 Zellen/mm² festgestellt.) unterteilt, so ergeben sich zwei Gruppen – eine Gruppe 1 mit einer ECD von 2000–2200 Zellen/mm² und eine Gruppe 2 mit einer ECD \geq 2200 Zellen/mm². Das mittlere Spenderalter in Gruppe 1 lag mit $75,8 \pm 11$ Jahren höher als das in Gruppe 2 mit $71,3 \pm 13$ Jahren. Der Unterschied im mittleren Alter zwischen den Gruppen war signifikant (p -Wert $< 0,001$). Interessanterweise lag das mittlere Spenderalter in der Gruppe der Hornhauttransplante mit ECD < 2000 Zellen/mm², die in der Abbildung 22 nicht dargestellt sind, noch höher, bei $76,5 \pm 10$ Jahren.

Auch in der Studie von Armitage et al. (36,52) wurde eine Interaktion zwischen Kulturdauer, ECD1 und Spenderalter während der Kultivierung beobachtet. Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses von Spender- und Kultivierungseigenschaften auf die Eignung von Hornhäuten aus Organkultur für die perforierende Keratoplastik mittels multifaktorieller Regressionsanalyse. Hornhäute mit mittlerem Spenderalter wurden in Organkultur bei 34°C gelagert. Der mittlere Spenderalter lag bei 57 ± 21 Jahren im Vergleich zu 73 ± 12 Jahren bei der vorliegenden Studie. Die maximale Kultivierungsdauer betrug in der Studie von Armitage et al. bis zu 5 Wochen, mit einem längeren Mittelwert von 22 ± 6 Tagen, im Vergleich zu dem Mittelwert in dieser Studie von $11,1 \pm 3,9$ Tagen.

Das Endothel wurde lichtmikroskopisch untersucht, und Hornhäute mit < 2200 Zellen/mm² wurden als ungeeignet für die perforierende Keratoplastik eingestuft. Die Zeit in der Organkultur beeinflusste sowohl die Wahrscheinlichkeit, dass die Hornhäute für perforierende Keratoplastik geeignet waren, als auch, ob sie als sehr gut oder ausgezeichnet eingestuft wurden. Mehr als 80 % der Hornhäute, die < 2 Wochen gelagert wurden, waren für eine perforierende Keratoplastik geeignet; dieser Anteil sank jedoch auf 57 % bei einer Lagerung von > 4 Wochen. Nur 23 % der Hornhäute wurden nach 4 Wochen Lagerung noch als sehr gut oder ausgezeichnet beurteilt, verglichen mit 53 % der < 2 Wochen gelagerten Hornhäute.

Es wurde jedoch festgestellt, dass Hornhäute von älteren Spendern tendenziell länger gelagert wurden als die von jungen Spendern. Hornhäute, die < 2 Wochen kultiviert wurden, stammen nur zu 35 % von Spendern über 60 Jahren, während 65 % der > 4 Wochen kultivierten Hornhäute von diesen älteren Spendern stammten. Es erfolgte im Anschluss eine multivariable Analyse, um den starken Einfluss des Spenderalters auf ECD zu berücksichtigen. Die OR aus der multifaktoriellen logistischen Regressionsanalyse berücksichtigen diesen Effekt des Spenderalters und bestätigen, dass längere Kulturdauer in der Tat mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, nicht geeignet zu sein bzw. keine sehr guten oder exzellenten Ergebnisse zu erzielen. Durch Korrektur der veränderten Altersverteilung der Spender konnte der tatsächliche Effekt der Kulturdauer geschätzt werden. Diese Berechnungen ergaben, dass der Anteil der für eine perforierende Keratoplastik geeigneten Hornhäute nach einer Kulturdauer von mehr als 28 Tagen von 83 % auf 66 % sank. Der Anteil der sehr guten oder ausgezeichneten Hornhäute sank im gleichen Zeitraum von 53 % auf 34 %. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kulturdauer einen größeren Einfluss auf die Eignung der Hornhäute für die perforierende Keratoplastik hatte bzw. darauf, ob die Hornhäute als sehr gut oder ausgezeichnet eingestuft wurden. Das Alter des Spenders war laut der Studie bei weitem der wichtigste Faktor, der den Grad der ECD beeinflusste, was völlig in Einklang mit der bekannten Abnahme der ECD mit zunehmendem Alter steht (52).

Unerwartet war jedoch die scheinbar langsamere Abnahme der Endothelqualität während der Kulturdauer mit zunehmendem Alter des Spenders. Da die anfängliche Zelldichte zu Beginn der Organkultur umgekehrt proportional zum Alter des Spenders war, könnte dieser Befund schlicht darauf hindeuten, dass die Anzahl der Endothelzellen kontinuierlich exponentiell abnahm – d. h., dass die Rate des Zellverlusts zu einem bestimmten Zeitpunkt proportional zur Zelldichte war. Folglich sollte der absolute Verlust von Zellen während der Kultivierung umgekehrt proportional zum Alter des Spenders sein, und die Halbwertszeit für den exponentiellen Rückgang sollte unabhängig vom Alter des Spenders sein. Die Halbwertszeiten für den Rückgang der Bewertungsnoten, die für jede Altersgruppe der Spender separat berechnet wurden, stützten diese Interpretation jedoch nicht: Anstatt für die verschiedenen Altersstufen konstant zu bleiben, erwiesen sich die Halbwertszeiten für Spender über 60 Jahre als wesentlich höher als diejenigen für junge Spender. Dies deutet darauf hin, dass Endothelzellen älterer Spender während der Organkultur stabiler sind als die Endothelzellen junger Spender. Diese Schlussfolgerung wird durch eine nach Spenderalter stratifizierte logistische Regressionsanalyse gestützt.

In der vorliegenden Studie wurde auch das Spenderalter aufgeschlüsselt, um die Verteilung der Spenderalter im Zusammenhang mit Kulturdauer zu überprüfen sowie Ergebnisse der Entwicklung von ECD der Spender über und unter 60 Jahren zu vergleichen und die mittlere Kulturdauer in diesen beiden Gruppen zu untersuchen. Der Unterschied in der mittleren

Kulturdauer war nicht signifikant (Altersstufe über 60 Jahre: Kulturdauer von $11,1 \pm 4$ [in Tagen], Altersstufe unter 60 Jahre, Kulturdauer von $10,6 \pm 3$ [in Tagen], $p = 0,93$). Darüber hinaus lag der Grenzwert für die Eignung zur perforierenden Keratoplastik in der Studie von Armitage et al. mit > 2200 Zellen/ mm^2 gegenüber 2000 Zellen/ mm^2 höher als bei der vorliegenden Studie.

In der Studie von Armitage et al. (36) wurde jedoch die Rolle der Zellkontakthemmung innerhalb der Kulturgefäßen nicht diskutiert, die bei den Transplantaten aus jüngerem Spender aufgrund ihrer höheren Dichte im Vergleich zu Transplantaten aus älteren Spendern einen größeren negativen Einfluss auf die Entwicklung der ECD haben könnte.

Von Beuschel et al. (13) werden neben den biologischen auch mechanische bzw. biometrische Einflüsse auf die Entwicklung der ECD in vivo diskutiert. Es wurde bei 191 gesunden Probanden eine Endothelmikroskopie durchgeführt, statistisch ausgewertet und in Relation zum Alter gesetzt. Es wurde eine lineare Abnahme der ECD mit einer mittleren Abnahme von $-7,58 \pm 0,97$ Zellen/ mm^2 pro Jahr mit zunehmendem Alter festgestellt. Die Abnahme der ECD erwies sich in den ersten drei Lebensdekaden als unterschiedlich zum späteren Alter (ab ca. 35 Jahren), denn ab 35 Jahren verlangsamte sich die Abnahme. Diese Verlangsamung der ECD-Abnahme in vivo könnte auf unterschiedliche Ausprägungen der biologischen gegenüber den mechanischen Eigenschaften hinweisen, vor allem von Zellkontakthemmung oder Konkurrenz an Wachstumsfaktoren.

In der vorliegenden Studie konnten aufgrund der Ergebnisse, insbesondere der logistischen Regressionsgleichungen im Unterkapitel (Veränderung der Endothelzelldichte), folgende Hypothesen bzw. Beobachtungen aufgestellt werden:

Hornhauttransplantate von älteren Spendern zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit der Kulturdauer bzw. die Endothelzelldichte entwickelte sich in dieser Gruppe von Hornhauttransplantaten nicht negativ mit längerer Kulturdauer. Interessanterweise konnte die geringere Zellkontakthemmung bei geringer Endothelzelldichte sowie geringe Konkurrenz um Wachstumsfaktoren während der Kultivierung als mögliche Gründe identifiziert werden. Diese beiden vorteilhaften Eigenschaften in dieser Gruppe von Transplantaten könnten stärker als biologische Eigenschaften wie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress sein. Sie wirken einer weiteren signifikanten Verschlechterung der ECD während langer Kulturdauer entgegen, wie dies bei Hornhäuten mit einer ECD < 2000 Zellen/ mm^2 in der vorliegenden Studie zu sehen ist.

Umgekehrt verhält es sich bei Hornhauttransplantaten jüngerer Spender. Hier ist aufgrund der hohen Dichte an Hornhautendothelzellen mit einer hohen Zellkontakthemmung und Konkurrenz um Wachstumsfaktoren während der Kultivierung, zu rechnen. Daher kann die

Hypothese aufgestellt werden, dass bei Hornhauttransplantaten von jüngeren Spendern eher die mechanischen Eigenschaften, d.h. die Zellkontakthemmung und die Konkurrenz um Wachstumsfaktoren durch die hohe Endotheldichte, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung spielen. Dieser Effekt ist bei Hornhauttransplantaten mit $ECD \geq 2000$ Zellen/ mm^2 zu beobachten. Bei Hornhauttransplantaten mit ECD zwischen 2000-2200 Zellen/ mm^2 scheint es jedoch zu einer Überlagerung beider Effekte, des biologischen und des mechanischen Effekts zu kommen, so dass im Vergleich zu Hornhauttransplantaten mit $ECD \geq 2200$ Zellen/ mm^2 ein zusätzlicher biologischer Nachteil resultiert aus dem hohen Spenderalter besteht, welches mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress einhergeht. In der Folge ist das Risiko einer negativen Konversion unter 2000 Zellen/ mm^2 signifikant erhöht. Interessanterweise lag das durchschnittliche Spenderalter in dieser Gruppe annähernd zu den Transplantaten mit $ECD < 2000$ Zellen/ mm^2 , es ergab sich kein signifikanter Unterschied (das mittlere Spenderalter in Transplantaten mit einer $ECD < 2000$ Zellen/ mm^2 : $76,5 \pm 10$ Jahren, in Transplantaten mit einer ECD 2000–2200 Zellen/ mm^2 : $75,8 \pm 11$ Jahren, p -Wert 0,056). Darüber hinaus scheint der Dichtebereich zwischen $ECD > 2200$ Zellen/ mm^2 und dem Grenzwert von 2000 Zellen/ mm^2 während der langen Kultivierung in der Gruppe mit $ECD > 2200$ Zellen/ mm^2 als Puffer oder Kompensationsmechanismus zu dienen, der einer negativen ECD -Konversion unter 2000 Zellen/ mm^2 entgegenwirkt, siehe Abbildung 22.

Abhängig vom Verhältnis der erwähnten biologischen und mechanischen Eigenschaften der Transplantate anhand ihrer initialen ECD zur Kulturdauer, kann es zu einer unterschiedlichen Entwicklung der ECD während der Kultivierung kommen.

7. Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser wissenschaftlichen Arbeit besteht darin, festzustellen, unter welchen Bedingungen optische Hornhauttransplantate mit $ECD \geq 2000$ Zellen/ mm^2 für die Hornhauttransplantationen zu liefern sind. Zudem soll herausgearbeitet werden, wie durch strukturiertes Management basierend auf wissenschaftlichen Belegungen in der Hornhautbank der Endothelzellverlust der entnommenen Transplantate vermieden werden kann. Aufgrund der Knappheit von Spendergewebe und einer allgemein geringen Bereitschaft zum Spenden stellt die zuvor gestellte Frage eine zentrale Herausforderung für den Betrieb von Hornhautbanken dar. Die Entwicklung der ECD während der Kultivierung wird in der Literatur sehr breit diskutiert.

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Spender- und präoperativen Eigenschaften einen Einfluss auf die ECD1 und ECD2 haben. Als Spendereigenschaften wurden das Geschlecht, das Spenderalter, der Linsenstatus und die Todesursache (Malignom /Sepsis) berücksichtigt. Zu den präoperativen Eigenschaften gehören das DEI und die Kulturdauer. Die Kulturdauer beeinflusst lediglich die ECD2. Weiterhin wurde die Entwicklung der ECD1 in der Kultivierungsphase zur ECD2 vor der Transplantation untersucht. Hierbei wurden zum einen der Einfluss von Spender- und präoperativen Eigenschaften getestet, zum anderen wurden nur die ECD1 und Kulturdauer als Einflussfaktoren betrachtet.

Die vorliegende Studie ermöglicht eine genauere Darstellung des Einflusses der Kulturdauer auf die Entwicklung der ECD während der Kultivierung. Genauere Erkenntnisse hierzu sind von großer Bedeutung für das Management von Hornhautbanken, insbesondere im Zusammenhang mit der Kultivierung von Hornhäuten. In der univariablen Analyse zeigte sich, dass ein niedrigeres Spenderalter, eine natürliche Linse, ein kurzes DEI und das Vorhandensein eines Malignoms sowohl die ECD1 als auch die ECD2 positiv beeinflussen. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Kulturdauer die ECD2 negativ. Die beschriebenen Effekte waren statistisch signifikant, wobei der Effekt von Vorhandensein von Malignom als Todesursache in der multivariablen Analyse nicht mehr signifikant war. Der negative Effekt der Kulturdauer stellte sich jedoch, im Vergleich zum positiven Effekt von ECD1, als der zweitstärkste Einflussfaktor auf die Entwicklung heraus, wenn beide Faktoren – Kulturdauer und ECD1 – als einzige Einflussgrößen auf die Entwicklung berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt der Kulturdauer abhängig von der ursprünglichen ECD vor der Kultivierung unterschiedlich ist.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Entwicklung der Endothelzellen ex vivo von vielen Faktoren beeinflusst wird. Zum einen scheinen

insbesondere eine niedrige ECD1 und eine längere Kulturdauer eine wichtige Rolle zu spielen. Die Kulturdauer hat einen negativen Einfluss, insbesondere auf Hornhäute mit einer niedrigen ECD1 knapp ≥ 2000 Zellen/mm² (ca. 2000–2200 Zellen/mm²), insbesondere ab dem 16. Tag der Kultivierung. Bei diesen Transplantaten ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine hohe ECD2 nach der Kultivierung erreicht wird, umso geringer, je niedriger die ECD1 vor der Kultivierung ist, insbesondere bei einer langen Kulturdauer. Diese wiesen mit ihren ECD1 von 2000–2200 Zellen/mm² ein erhöhtes Risiko auf, dass ihre anfängliche Endothelzellichte unter den Grenzwert von 2000 Zellen/mm² absinkt, im Vergleich zu Hornhäuten mit einer höheren ECD1 (> 2200 Zellen/mm²). Das Risiko für eine solche Konversion liegt bei Transplantaten mit niedriger ECD1 (2000–2200 Zellen/mm²) bei etwa 20 %, verglichen mit 10 % bei Transplantaten mit höherer ECD1 (> 2200 Zellen/mm²). Letztere bleiben trotz einer Kulturdauer von über 16 Tagen resistenter gegen eine negative Konversion der Endothelzellichte unter 2000 Zellen/mm². Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Kulturdauer keine signifikant negativen Auswirkungen auf die Transplantate hatte, die eine ECD1 < 2000 Zellen/mm² aufwiesen. Das könnte zum Beispiel durch hohe Konkurrenz an Wachstumsfaktoren während der längeren Kulturdauer oder starke Zellkontakthemmung innerhalb des Transplantats mit hoher ECD erklärt werden. Zudem könnte bei den Transplantaten mit der ECD1 von 2000–2200 Zellen/mm² behauptet werden, dass durch das schlechtere Ansprechen an Wachstumsfaktoren sowie Anfälligkeit zum oxidativen Stress zur negativen Konversion kommt. Insbesondere, weil Hornhäute dieser Gruppe im größeren Teil von älteren Spendern stammen. Der Effekt könnte eventuell durch die Verkürzung der Kulturdauer oder ggf. durch einen zusätzlichen Mediumwechsel verbessert werden und sollte in Rahmen einer experimentellen Studie untersucht werden. Im Gegenteil: Die Transplantate mit einer Endothelzellichte > 2200 Zellen/mm² weisen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress auf. Dieser Effekt ist auf das niedrige mittlere Spenderalter zurückzuführen ist. Zudem weisen sie einen gewissen Puffer von Endothelzellichte auf, der der negativen Konversion der ECD unter 2000 Zellen/mm² entgegenwirkt.

Die Ergebnisse dieser Studie bilden eine Grundlage für weitere statistische, klinische oder experimentelle Untersuchungen. Zudem ermöglichen sie einen besseren Überblick in der Hornhautbank, insbesondere während der Kultivierungsphase, in der die Hornhäute je nach ihrer Endothelzellichte unterschiedliche Reaktionen im Hinblick auf die Entwicklung im Kulturmedium zeigen. Im Rahmen weiterer Studien, die mehrere ECD-Messungen im Vergleich zu dieser Studie während der Kultivierung umfassen, könnten diese Beobachtungen bzw. Bemerkungen einer weiteren Erklärung zugeführt werden. Zudem könnten gezielte unterschiedliche Kulturdauern von Transplantaten, die nach ihrer ursprünglichen ECD bereits eingruppiert wurden, wie die Eingruppierung in dieser Studie, die beobachteten negativen Effekte der Kulturdauer besser darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Dapena I, Ham L, Melles GRJ. Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK-the thinner the better? *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20(4):299–307.
2. Flockerzi E, Turner C, Seitz B, Collaborators GSG. Descemet's membrane endothelial keratoplasty is the predominant keratoplasty procedure in Germany since 2016: a report of the DOG-section cornea and its keratoplasty registry. *British Journal of Ophthalmology.* 2024;108(5):646–53.
3. Schroeter J, Maier P, Bednarz J, Blüthner K, Quenzel M, Pruß A, et al. Procedural guidelines: Good tissue practice for cornea banks. *Ophthalmologe.* 2009;106(3):265–76.
4. Grehn F. Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Auges. In: *Augenheilkunde.* Springer; 2019. p. 5–21.
5. Seitz B, Blüthner K, Kruse FE, Reinhard T, Sundmacher R. Hornhauttransplantation: Zu geringe Spendenbereitschaft. *Dtsch Arztebl.* 2004;101(49).
6. Nishida T, Saika S. Cornea and sclera: anatomy and physiology. *Cornea.* 2010;1:3–24.
7. Augustin AJ. Hornhaut. In: *Augenheilkunde.* Springer; 2001. p. 225–53.
8. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):190.
9. Baumeister M, Kohnen T. Anatomie des Augenvorderabschnitts. In: *Refraktive Chirurgie.* Springer; 2011. p. 11–24.
10. Plange N. Hornhaut, Sklera. In: *Basiswissen Augenheilkunde.* Springer; 2017. p. 161–92.
11. Farjo AA, Brumm M V, Soong HK, Hood CT. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. *Ophthalmology E-Book.* 2018;155.
12. Akerlof. *Refraktive Chirurgie Springer.* Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling.* 1970. 1689–1699 p.
13. Beuschel R, Hofmann T, Messerli J. C. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2015;232(04):375–9.
14. Zavala J, Jaime GRL, Barrientos CAR, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye.* 2013;27(5):579–88.
15. Willoughby CE, Ponzin D, Ferrari S, Lobo A, Landau K, Omid Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function—a review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2010;38:2–11.
16. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):16–23.
17. Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF- β 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(7):2152–9.
18. Joyce NC, Meklikr B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(4):645–55.
19. Spenderhornhäuten V. *Richtlinie.* 2018;1–18.

20. Schön F, Gericke A, Bu JB, Apel M, Poplawski A, Schuster AK, et al. How to predict the suitability for corneal donorship? *J Clin Med*. 2021;10(15):3426.
21. McGlumphy EJ, Margo JA, Haidara M, Brown CH, Hoover CK, Munir WM. Predictive value of corneal donor demographics on endothelial cell density. *Cornea*. 2018;37(9):1159–62.
22. 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. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2020;237(11):1334–42.
23. Gupta AKR, Gupta RKR. Quantitative and morphological analysis of endothelial cells of donor corneas. *Kerala Journal of Ophthalmology*. 2018;30(2):103–6.
24. Orski M, Synder A, Pałenga-Pydyn D, Omulecki W, Wilczyński M. The effect of the selected factors on corneal endothelial cell loss following phacoemulsification. *Klin Oczna*. 2014;116(2).
25. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2001;20(1):59–63.
26. Uphoff J, Bednarz J, Engelmann K. Verlauf der Endothelzeldichte nach perforierender Keratoplastik Einfluss von spender-und empfängerabhängigen Faktoren. *Der Ophthalmologe*. 2001;98(6):550–4.
27. Röck T, Hofmann J, Thaler S, Bramkamp M, Bartz-Schmidt KU, Yoeruek E, et al. Factors that influence the suitability of human organ-cultured corneas. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2016;254:135–41.
28. Zhuang XY, Gao L, Qi BX, Wang N, Zhang JY, Gao H, et al. Analysis of factors affecting the quality of donor corneal endothelial cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2023;59(10):814–23.
29. Sahoo S, Jamil Z, Sahu SK, Ali MH, Priyadarshini SR, Das S. Comparison of corneal tissue profile of pseudophakic and phakic donors. *Eye Contact Lens*. 2022;48(4):180–4.
30. Rohrbach JM, Lisch W, Seitz B. Die Hornhaut als Indikator für Systemerkrankungen. *Der Ophthalmologe*. 2018;115(11):975–86.
31. Vasiliauskaitė I, De Jong M, Quilendrino R, Van Der Wees J, Oellerich S, Melles GRJ. Use of corneas from septic donors for descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2021;40(1):33–8.
32. Redbrake C, Becker J, Salla S, Stollenwerk R, Reim M. The influence of the cause of death and age on human corneal metabolism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(9):3553–6.
33. Krohn J, Høvdning G. The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005;83(6):746–50.
34. Medicines ED for the Q of, d'Europa C. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2019.
35. Hofmann N, Wittmershaus I, Salz AK, Börgel M. Cornea procurement and processing up to 72 hours: no risk for cornea transplant quality. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2021;48(1):3–11.

36. Armitage WJ, Jones MNA, Zambrano I, Carley F, Tole DM. The suitability of corneas stored by organ culture for penetrating keratoplasty and influence of donor and recipient factors on 5-year graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(2):784–91.
37. Böhringer D, Reinhard T, Spelsberg H, Sundmacher R. Influencing factors on chronic endothelial cell loss characterised in a homogeneous group of patients. *British journal of ophthalmology.* 2002;86(1):35–8.
38. Shehab A, Gram N, Ivarsen A, Hjortdal J. The importance of donor characteristics, post-mortem time and preservation time for use and efficacy of donated corneas for posterior lamellar keratoplasty. *Acta Ophthalmol.* 2022;100(3):269–76.
39. Sampaio TL, Rodrigues IP, Cresta MBL, Queiroz AC de O, Victer TN da F, Pontes DFS, et al. Factors influencing endothelial cell density of corneas for transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2021;22(2):263–75.
40. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(6):1743–51.
41. Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, et al. Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for corneal donor tissue in organ culture at 31° C. *Archives of ophthalmology.* 2003;121(4):442–50.
42. de Mora MRC, Groeneveld-van Beek EA, Frank LE, van der Wees J, Oellerich S, Bruinsma M, et al. Association between graft storage time and donor age with endothelial cell density and graft adherence after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(1):91–4.
43. Culbertson WW, Abbott RL, Forster RK. Endothelial cell loss in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1982;89(6):600–4.
44. Wakefield MJ, Armitage WJ, Jones MNA, Kaye SB, Larkin DFP, Tole D, et al. The impact of donor age and endothelial cell density on graft survival following penetrating keratoplasty. *British Journal of Ophthalmology.* 2016;100(7):986–9.
45. Wulle KG, Lerche W. Electron microscopic observations of the early development of the human corneal endothelium and Descemet's membrane. *Ophthalmologica.* 1969;157(6):451–61.
46. Wulle KG. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1972;11(11):897–904.
47. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(10):2930–5.
48. Schultz G, Cipolla L, Whitehouse A, Eiferman R, Woost P, Jumblatt M. Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. *Cornea.* 1992;11(1):20–7.
49. Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1980;77(7):4094–8.
50. Blake DA, Yu H, Young DL, Caldwell DR. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(6):1119–29.

Literaturverzeichnis

51. 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.
52. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985;4(6):671–8.

Abkürzungsverzeichnis

1. ECD _____ *Endothelzelldichte*
2. ECD1 _____ *Initiale Endothelzelldichte*
3. ECD2 _____ *Endgültige Endothelzelldichte*
4. ATP _____ *Adenosintriphosphat*
5. CDK _____ *Cyclin-abhängige Kinase*
6. CKI _____ *Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor*
7. DNA _____ *Desoxyribonukleinsäure*
8. CV _____ *Varianzkoeffizienten*
9. MW _____ *Mittelwert*
10. KI _____ *Konfidenzintervall*
11. SD _____ *Standardabweichung*
12. EDTA _____ *Ethylendiamintetraessigsäure*
13. pRb _____ *Retinoblastom-Protein*
14. TGF- β 2 _____ *Transforming Growth Factor beta 2*
15. DEI _____ *Death-To-Explantation-Interval*
16. PK _____ *perforierende Keratoplastik*
17. DMEK _____ *Descemet Membrane endothelial Keratoplasty*
18. DSAEK _____ *Descemet's stripping automated endothelial Keratoplasty*
19. EBAA _____ *Eye Bank Association of America*
20. EEBA _____ *European Eye Bank Association*
21. FED _____ *Fuchs endothelial Dystrophy*
22. PBK _____ *Pseudophakic bullous Keratopathy*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Hornhaut, Grehn, Physiologie und Pathophysiologie des Auges 2019 (4).	5
Abbildung 2: A: Positive und B: Negative Regulation der Proliferation des Zellzyklus, Joyce et al. 2012 (16) CDK: Cyclin Dependent Kinase, TGF: Transforming Growth Factor, E2F: Transcription factor in Eukaryotes, TGF- β , RB: retinoblastoma Tumorsuppressor, p53: Tumor Protein 53, Cell Cycle Periods (G0: Rest-Phase, G1: Growth-Phase, S: Synthesis-Phase, G2: Replication-Phase, M: Mitosis-Phase	7
Abbildung 3: Ablauf der Hornhauttransplantation unter Berücksichtigung der Spender- und präoperativen Faktoren sowie der zellulären Einflussfaktoren während der Kultivierung	8
Abbildung 4: Ablauf einer Hornhautentnahme und deren Kultivierung. Eigene Darstellung.	15
Abbildung 5: Mikroskopische Untersuchung der Endothelzellichte	15
Abbildung 6: Verteilung der Kulturdauer (in Tagen) im untersuchten Zeitraum	21
Abbildung 7: Verteilung des Mittelwertes der ECD1 im untersuchten Zeitraum.	22
Abbildung 8: Verteilung des Mittelwerts der ECD1 in Abhängigkeit vom Linsenstatus.	23
Abbildung 9: Verteilung des Mittelwerts ECD2 im untersuchten Zeitraum.	24
Abbildung 10: Verteilung des Mittelwerts der ECD2 nach Linsenstatus	25
Abbildung 11: Zusammenhang zwischen ECD1 und Spenderalter.	29
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen ECD2 und Spenderalter.	29
Abbildung 13: Zusammenhang zwischen ECD2 und Death-To-Explantation-Interval.	29
Abbildung 14: Zusammenhang zwischen ECD1 und Death-To-Explantation-Interval.	29
Abbildung 15: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2	29
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen ECD2 und Kulturdauer.	29
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD1 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten	30
Abbildung 18: ROC-Kurve für das Vorhersagemodell von ECD1 als quantitative Variable	32
Abbildung 19: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für ECD2 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten	33
Abbildung 20: ROC-Kurve für Vorhersagemodell von ECD2 als quantitative Variable.	34
Abbildung 21: Verschiedene Effekte der Kulturdauer auf die Entwicklung der ECD1 zur ECD2 zwischen den Gruppen; ECD1 < 2000 Zellen/mm ² und ECD1 \geq 2000 Zellen/mm ²	36
Abbildung 22: Wahrscheinlichkeit für Konversion von der endgültigen ECD < 2000 Zellen/mm ² in Abhängigkeit der ECD1 und Kulturdauer. Farbkodierung: grün: Wahrscheinlichkeit, dass ECD2 \geq 2000 Zellen/mm ² , gelb: grenzwertig, rot: < 2000 Zellen/mm ²	37
Abbildung 23: Aus Modell vorhergesagte ECD2 in Abhängigkeit von ECD1 und Kulturdauer, Farbkodierung: ECD2 \geq 2000 Zellen/mm ² , grün: Wahrscheinlichkeit, dass ECD2 \geq 2000 Zellen/mm ² , gelb: grenzwertig, rot: < 2000 Zellen/mm ²	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschlusskriterien für die Hornhautspende in der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz. Die Tabelle stammt aus Schön et al. (20) und ist angelehnt an die Richtlinien zur Gewinnung von Spenderhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank 2018 (19).....	13
Tabelle 2: Verteilung des Linsenstatus in der Studie.	19
Tabelle 3: Verteilung des Linsenstatus im untersuchten Zeitraum.....	20
Tabelle 4: Verteilung der Todesursachen im untersuchten Zeitraum.	20
Tabelle 5: Verteilung des Mittelwerts der ECD1 in verschiedenen Altersstufen.	23
Tabelle 6: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten je nach Death-To-Explantation- Interval in Stunden (h).....	24
Tabelle 7: Verteilung des Mittelwerts der ECD2 in verschiedenen Altersstufen.	25
Tabelle 8: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten je nach DEI in Stunden (h). 26	
Tabelle 9: Verteilung von optischen und nicht-optischen Transplantaten abhängig von der Kulturdauer.....	26
Tabelle 10: Zusammenhang von ECD1/ECD2 mit kategorialen Variablen; p: Signifikanzwert.	27
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 und dem Spenderalter; R: Korrelation/Regressionskoeffizient; p: Signifikanzwert.	28
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen ECD1 und ECD2 und den präoperativen Eigenschaften (DEI und Kulturdauer); R: Korrelation/Regressionskoeffizient; p: Signifikanzwert.....	28
Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der ECD1 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.....	30
Tabelle 14: Vorhersagemodell von Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie der Kulturdauer auf die ECD2 quantitativ während der Kultivierung mittels gemischten linearen Modells.	31
Tabelle 15: Vorhersagemodell von Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie der Kulturdauer auf die ECD2 quantitativ während der Kultivierung mittels gemischten linearen Modells.....	32
Tabelle 16: Zusammenhang zwischen den beobachteten Werten für die ECD2 und den nach dem obigen Modell vorhergesagten Werten.....	33
Tabelle 17: Zusammenhang zwischen Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie Kulturdauer auf negative Änderung der ECD durch das logistische Regressionsmodell.	35
Tabelle 18: Zusammenhang zwischen Spender- und präoperativen Eigenschaften sowie Kulturdauer und positiver Änderung der ECD durch das logistische Regressionsmodell.	38

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen besonderen Dank an meine Doktormutter, Frau PD Dr. Joanna Wasielica Poslednik, richten. Sie hat mich während des gesamten Forschungsprojekts mit ihrer Expertise und ihrem Engagement unterstützt und damit wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ihre Betreuung war exzellent und ihre Bereitschaft, mich in meiner Arbeit zu unterstützen und zu fördern, außerordentlich. Ich bin ihr zudem für die zahlreichen anregenden Diskussionen dankbar, die wir während des Forschungsprojekts führen durften.

Ebenso danke ich Frau Dr. Irene Schmidmann. Sie stand mir jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit zur Seite, insbesondere im statistischen Anteil. Ich möchte mich außerdem bei dem Mitarbeiter der Hornhautbank des Rheinland-Pfalz bedanken, insbesondere bei Frau Dr. rer. nat. Apel. Sie stand mir im Rahmen meiner Doktorarbeit jederzeit für Fragen oder Anregungen zur Verfügung.

Ich möchte zudem meiner Frau, meinen Kindern und Eltern, meinen Geschwistern und Freunden meinen Dank aussprechen. Ihre Geduld und Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation waren von unschätzbarem Wert.

Danksagung

Lebenslauf

Danksagung