

Aus dem
CharitéCentrum 14 für Tumormedizin
Institut für Transfusionsmedizin
Direktor (komm.): Prof. Dr.med. Axel Pruß

Habilitationsschrift

Einflussfaktoren auf das corneale Endothel organkultivierter Spenderaugenhornhäute

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach experimentelle Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jan Schroeter

Eingereicht: Juli 2024

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	4
1.1. Kultivierungstechniken	5
1.2. Gesetzliche Regelungen	
1.3. Funktionelle Bedeutung des cornealen Endothels	6
1.4. Endothelzellevaluation	7
2. Eigene Arbeiten	15
2.1. Automatische Endothelzelllichtbestimmung bei organkultivierten Spenderaugenhornhäuten	15
2.2. Validierung eines Systems zur automatischen Endothelzelllichtbestimmung bei organkultivierten Spenderaugenhornhäuten	22
2.3. Der Einfluss osmotisch stimulierender Lösungen auf die corneale Endothelzelllichte	26
2.4. Der Einfluss von hypothermen Temperaturen auf die corneale Endothelzellen	33
2.5. Der Einfluss von hyperthermen Temperaturen auf die corneale Endothelzellen	38
3. Diskussion	45
4. Zusammenfassung	52
5. Literaturangaben	53
6. Danksagung	59
7. Erklärung	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1: mikroskopische Beurteilung der Endothelzellschicht einer Spenderaugenhornhaut mittel Phasenkontrastmikroskop	9
Abb. 2: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild ohne und mit osmotischer Stimulierung mit hypotoner BSS Lösung	9
Abb. 3: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut im gequollenen (links) und im entquollenen Zustand (rechts)	10
Abb 4.: Manuelle Endothelzelldichtebestimmung mittels fixed frame und L Zählmethode	11
Abb. 5: Digitale Abbildung des phasenkontrastmikroskopischen Endothelzellbildes (200 fache Vergrößerung) im Computerprogramm Navis (Nidek Technologies)	11
Abb. 6: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links konfluierende nekrotische Endothelzellen, rechts nekrotische (Zellkerne durch Trypanblau intensiv gefärbt) neben intakten Endothelzellen	13
Abb. 7: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links geringer, rechts ausgeprägter Polymegatismus und Pleomorphismus	14
Abb. 8: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links zahlreiche Guttae, rechts ausgeprägter Vakuolisierung und Granulierung der Endothelzellen	15

Abkürzungen

AMG	Arzneimittelgesetz
AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
BÄK	Bundesärztekammer
BSS	Balanced Salt Solution
DOG	Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft e.V.
DMEK	Descemetmembran-Endothel-Keratoplastik
MEM	Modified Eagle Medium
SD	Standard Deviation/ Standardabweichung
TPG	Transplantationsgesetz
TPG-GewV	Transplantationsgesetz - Gewebeverordnung

1. Einleitung

1.1. Kultivierungstechniken

Erstmals gelang 1906 Eduard Zirm die erfolgreiche Übertragung einer humanen Cornea auf einen durch eine schwere Hornhautverletzung erblindeten Patienten [Zirm 1906]. Der Bedarf an humanen Spenderaugenhornhäuten stieg in der Folge, anhaltend bis heute, stetig [Flockerzi 2018 und 2023]. Dieser Nachfrage wurde im Wesentlichen dadurch Rechnung getragen, dass eine Möglichkeit etabliert wurde, Hornhäute toter Spender zu transplantieren. Dies ist wesentlich dem russischen Ophthalmochirurgen Vladimir Petrovich Filatov zu verdanken, der dieses Konzept erfolgreich im Jahre 1937 etablierte [Filatov 1937]. Die Augenhornhauttransplantate wurden zum Zeitpunkt der Keratoplastik direkt aus dem Spenderauge entnommen, welches nach dessen Explantation unter möglichst aseptischen Bedingungen gekühlt in einem verschlossenen Glasgefäß mit feuchtem Verbandsmull gelagert wurde. Mit dieser Methode war die Transplantation der Cornea bis zu 48 Stunden nach dem Tod des Spenders möglich. Ab den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts entstanden die ersten Augenhornhautbanken, zuerst in New York City, USA und in London, England, um die Gewinnung, Entnahme, Lagerung und Verteilung von Spenderaugen zu organisieren [Paton 1950]. Strategisch wichtig für eine bessere Verfügbarkeit von Spendergewebe war eine Transplantierbarkeit über 48 Stunden nach dem Versterben des Spenders hinaus. Daher wurden im Verlauf verschiedene Nährmedien entwickelt, die eine Lagerung der isolierten Augenhornhaut für mehrere Tage bis zur Transplantation, zuerst in gekühltem Zustand ermöglichten. 1974 entwickelten McCarey und Kaufmann ein Nährmedium auf der Basis eines Zellkulturmediums für diese Zwecke, welches in sehr ähnlicher Form bis heute eine weit verbreitete Anwendung findet [Mc Carey 1974]. Diese gekühlte Lagerung der isolierten Spenderaugenhornhaut in einem Nährmedium bei +2 bis +6°C, die als hypotherme Lagerung bzw. als Kurzzeitkultur bezeichnet wird, ist weiterhin eine verbreitete Standtechnik, insbesondere in Nordamerika.

1973 berichteten Summerlin et al. erstmals über die Lagerung der humanen Spenderaugenhornhaut unter physiologischen Bedingungen in der sogenannten Organkultur, eine der Zellkultur entlehnten Lagerung der gesamten Cornea in einem Nährmedium bei einer Temperatur über 30°C [Summerlin 1973, Doughman 1974, Bourne 1977]. Diese Methode zur Konservierung humaner Spenderaugenhornhäute, initial als Minnesota Hornhaut-

kultivierungssystem bezeichnet, wurde durch Nils Ehlers an die Universitätsaugenklinik Aarhus in Dänemark geholt [Sperling 1978, Sperling 1979, Ehlers 1990]. Von dort aus hat sich diese Methode rasch in Europa in den folgenden Jahren unter der Bezeichnung Organkultur verbreitet und ist heute als etablierter Standard die Routinemethode der Spenderaugenhornhautkultivierung in Deutschland [Lindstrom 1986, Pels 1983, Pels 1997, Maas-Reijs 1997].

1.2. Gesetzliche Regelungen

Bis 1997 das erste Transplantationsgesetz (TPG) in Deutschland in Kraft trat waren die Augenhornhautspende und -konservierung ohne bedeutende Reglementierungen. Mit der Etablierung des Transplantationsgesetzes in seiner ersten Fassung wurden die humanen Spenderaugenhornhäute explizit vom § 2 (8) Arzneimittelgesetz ausgenommen und dem Organbegriff zugeordnet. Damit war zwar die Spende von Augenhornhäuten und deren Entnahme eindeutig rechtlich festgelegt, die Konservierung der gewonnenen Spenderaugenhornhäute und deren Bereitstellung zur Transplantation blieben unreguliert. Im August 2000 wurden erstmals Richtlinien der Bundesärztekammer zum Führen einer Augenhornhautbank veröffentlicht, die von jeder Hornhautbank in der Bundesrepublik Deutschland zu beachten waren. Durch die Geweberichtlinie 2004/23/EG und die ergänzenden zwei weiteren Richtlinien 2006/17/EG und 2006/86/EG der Europäischen Union, die für alle Mitgliedstaaten verbindlich in nationales Recht umgesetzt werden mussten, war die Notwendigkeit entstanden, alle Gewebetransplantate humanen Ursprungs durchgängig von deren Gewinnung bis zu deren Abgabe zur Transplantation vollumfänglich regulatorisch einzuordnen [European Union Commission Directive 2004 und 2006]. In Deutschland wurde politisch entschieden, solche Gewebetransplantate als sogenannte Gewebesubereitungen in das Arzneimittelgesetz aufzunehmen. Dies geschah 2007 mit dem Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebegesetz). Dieses Artikelgesetz änderte bzw. ergänzte u.a. das Arzneimittelgesetz (AMG), das Transplantationsgesetz (TPG), die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) sowie die TPG-Gewebeverordnung (TPG-GewV) [Bundesgesetzblatt 2008 und 2012].

Für die Deutschen Augenhornhautbanken begann mit dem Inkrafttreten des Gewebegesetzes ein neuer Abschnitt ihrer Tätigkeiten. War bisher deren Arbeit weder genehmigungs- noch kontrollpflichtig, waren nun eine Herstellungserlaubnis der zuständigen Landesbehörde und

eine Genehmigung zum Inverkehrbringen, also der Abgabe der Augenhornhauttransplantate an den Ophthalmochirurgen zur Transplantation, des Paul-Ehrlich-Institutes als zuständige Bundesoberbehörde notwendig. Sowohl die Erlaubnis als auch die Genehmigung verlangen ein Antragsverfahren jeder einzelnen Augenhornhautbank. Nach einer Phase der Verunsicherung und Sorge um den Bestand der etablierten und funktionierenden Strukturen vereinbarten die Deutschen Augenhornhautbanken, die damals schon in einer Arbeitsgemeinschaft bei der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft e.V. (DOG) organisiert waren, ein Musterantragsverfahren beim Paul-Ehrlich-Institut. Dieser Musterantrag für die Gewebezubereitung humane organkultivierte Augenhornhaut wurde federführend von der Augenhornhautbank der Charité – Universitätsmedizin Berlin erstellt [Schroeter 2008]. Nachfolgend gelang es allen Kooperationspartnern eine eigene Genehmigung zu erlangen. Zur Unterstützung dieses Musterantragsverfahrens veröffentlichte die Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Augenhornhautbanken der DOG, die im Verlauf zur Sektion Biotechnologie und Gewebetransplantation wurde, 2009 aktuelle Durchführungsbestimmungen, die über die Richtlinie der Bundesärztekammer (BÄK) von 2000 hinausgingen [Schroeter 2009]. Im Jahre 2018 wurde diese BÄK Richtlinie grundlegend überarbeitet und ergänzt [Bundesärztekammer 2018].

Im Rahmen des Antragsverfahrens zum Erlangen der Genehmigung des Paul-Ehrlich-Institutes war es notwendig, bisher etablierte Verfahren zur Gewinnung, Kultivierung und Prüfung von Spenderaugenhornhäuten und folglich deren Freigabe zur Transplantation wissenschaftlich zu belegen. Die Aufgabe des Antragsstellers war es, die Wirksamkeit und die Sicherheit eines Augenhornhauttransplantates für den Empfänger nachzuweisen. Dies führte bei vielen Kollegen zum kritischen Hinterfragen von etablierten Prozessen und als Konsequenz häufig zu Änderungen im Sinne deren Optimierung.

1.3. Funktionelle Bedeutung des cornealen Endothels

Die Cornea hat zweifelsfrei mindestens eine faszinierende Besonderheit. Sie ist als lebendes Gewebe zusammengesetzt aus unterschiedlichen Zelltypen und Kollagenfasern klar und optisch transparent. Den Menschen war die Ursache dieser Transparenz lange Zeit unklar. 1953 erkannte Stocker, dass zur Sicherung der Transparenz einer transplantierten Cornea im Empfängerauge die Vitalität des Hornhautendothels von entscheidender Bedeutung ist [Stocker 1953]. Die Endothelzellschicht besteht aus einer Einzelschicht hexagonaler Zellen mit

einem Durchmesser von ca. 22 μm und einer Oberfläche von 250 μm^2 . Die zentrale Zelldichte beträgt beim jungen Erwachsenen ca. 3500/ mm^2 und nimmt mit fortschreitendem Alter sowie vom Rand zum Zentrum der Cornea ab. Eine der wichtigsten Aufgaben des Endothels ist die Aufrechterhaltung des Hydratationszustandes und damit der Transparenz der Cornea über einen aktiven, energieabhängigen Pumpmechanismus (Na^+ - K^+ -ATPase) und die physikalische Barrierefunktion („leaky barrier“), die den Einstrom von Flüssigkeiten und gelösten Stoffen vom Stroma in das Kammerwasser verhindert [Waring 1982].

Das Endothel ist die aufgrund seiner reichlichen Ausstattung mit zytoplasmatischen Kompartimenten die stoffwechselaktivste aber auch zugleich empfindlichste Schicht der menschlichen Hornhaut. Die Zellgrenzen sind ineinander verzahnt und überlappen. Das zytochemische Muster ist, entgegen ihrer Bezeichnung, nicht endothelzelltypisch, da charakteristische Marker fehlen. Es ähnelt eher dem der Epithelzellen der Hornhaut [Shamsuddin 1986]. Die Abnahme der Endothelzelldichte ist einerseits mit fortschreitendem Alter zu beobachten, kann aber auch durch ophthalmochirurgische Eingriffe, z.B. eine Kataraktoperation, verursacht oder durch Verletzungen bedingt sein [Capella 1969, Sperling 1980, Storr-Paulsen 2008].

Nach einer Augenhornhauttransplantation ist der Endothelzellverlust des Transplantates gegenüber der normalen altersassoziierten Abnahme um das 7-15 fache beschleunigt. Eine geringe initiale Endothelzelldichte eines Transplantates ist die wesentlichste Ursache für ein spätes Transplantatversagen [Culbertson 1982]. Daher ist die Endothelzelldichte eines Augenhornhauttransplantates von besonderer Bedeutung und eine Mindestzelldichte ein entscheidendes Freigabekriterium. Eine zentrale Endothelzelldichte von 2000 Zellen/ mm^2 ist dabei eine etablierte Mindestgröße.

1.4. Praktisches Vorgehen bei der Endothelevaluation organkultivierter Spenderaugenhornhäute

Die Beurteilung der Endothelzellschicht organkultivierter Spenderaugenhornhäute erfolgt lichtmikroskopisch. Ein inverses Phasenkontrastmikroskop ist dafür besonders geeignet, da dabei die Endothelzellschicht nah zum Objektiv ist. Die Augenhornhaut befindet sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung in einem sterilen, geschlossenen, durchsichtigen Gefäß wie z.B. einer Gewebekulturschale in Medium oder Elektrolytlösung. Während der Mikroskopie ist darauf zu achten, dass die sterilen Bedingungen im Inneren des Gefäßes

erhalten bleiben. Idealerweise erfolgt die Mikroskopie innerhalb einer Sicherheitswerkbank unter Reinraumbedingungen (Abbildung 1).

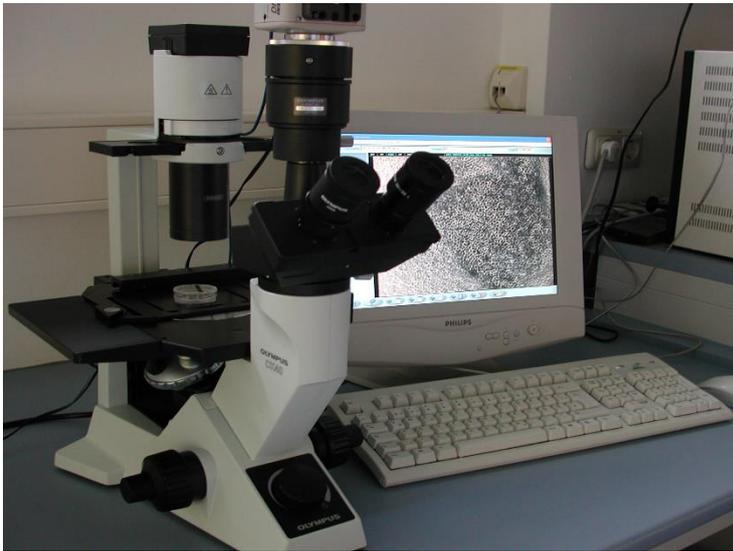


Abb. 1: mikroskopische Beurteilung der Endothelzellschicht einer Spenderaugenhornhaut mittel Phasenkontrastmikroskop (CK 40, Olympus, Hamburg, Deutschland); eigene Abbildung.

Für die Mikroskopie im inversen Phasenkontrastmikroskop wird die Augenhornhaut idealerweise so in das Gefäß gelegt, dass die Endothelseite (die Hornhaut liegt auf dem verbliebenen Sklerarand) dem Objektiv zugewandt ist.

Zur Visualisierung der Endothelzellen ist eine osmotische Stimulation mittels hypotoner Lösungen notwendig. Die Endothelzellen nehmen dadurch Wasser auf und durch die entstehenden Zugkräfte an den überlappenden Zellgrenzen kommt es zu deren Sichtbarkeit. Ohne eine solche Stimulation sind nur Zellkerne erkennbar (Abbildung 2).

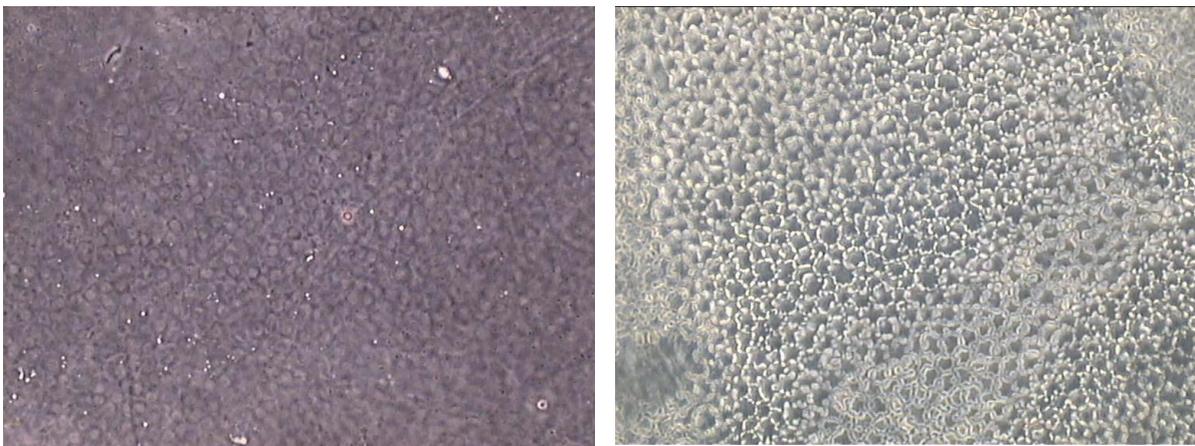


Abb. 2: corneale Endothelzellschicht im Phasenkontrastmikroskopischen Bild (200 fache Vergrößerung) ohne (links) und mit osmotischer Stimulation mit hypotoner BSS Lösung (rechts); eigene Abbildung.

Bewährt hat sich dafür die Verwendung von hypotoner BSS Lösung (Zusammensetzung: in 1000 Aqua ad inj. sind gelöst: 4,90 g NaCl, 0,75 g KCl, 0,49 g CaCl 2H₂O, 0,30 g MgCl₂ 6H₂O, 3,90 g Natriumacetat 3H₂O, 1,70 g Natriumcitrat 2H₂O; pH ca. 7,76). In ein geeignetes Gefäß wird steriles, hypotones BSS gefüllt und die Hornhaut darin unter das Mikroskop gestellt. Nach wenigen Sekunden werden die Zellgrenzen deutlich sichtbar und die einzelnen Endothelzellen erkennbar.

Weitere Möglichkeiten der osmotischen Beeinflussung bestehen in der Verwendung von 0,45 %iger Natriumchloridlösung sowie 1,8 %iger Succroslösung. Erfahrungsgemäß ist es sinnvoll, die hypotonen Lösungen mit einer physiologischen, isotonen Lösung (z.B. 0,9 %iger Natriumchloridlösung) zu mischen. Dadurch kann man bei guter Erkennbarkeit den osmotischen Streß für die Zellen auf ein Mindestmaß reduzieren.

Die Endothelzellen der Spenderhornhaut sind nicht immer gleich gut visualisierbar. Mit zunehmender Quellung der Hornhaut im Kulturmedium sind die Endothelzellen schlechter zu erkennen (Abbildung 3).

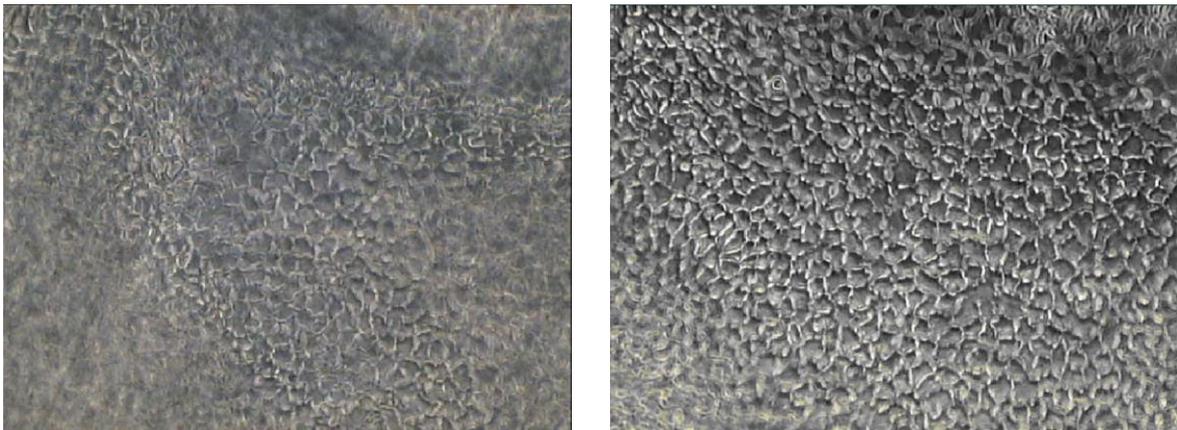


Abb. 3: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung) im gequollenen (links) und im entquollenen Zustand (rechts); eigene Abbildung.

Drei Aspekte sind bei der Endothelzellbeurteilung relevant: Deren Anzahl bzw. Dichte, die Morphologie und die Vitalität. Bei der abschließenden Beurteilung der Spenderaugenhornhaut am Ende der Organkultur erfolgt die Mikroskopie im Zentrum und in den vier parazentralen Quadranten.

Endothelzelldichte

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Bestimmung der Endothelzelldichte beruhen alle auf dem gleichen Prinzip. Die Endothelzellen werden zuerst mikroskopisch sichtbar gemacht und

dann abgebildet. Zur Abbildung der Endothelzellen eignet sich besonders eine an das Mikroskop angeschlossene Kamera. Auf die Endothelzellabbildung wird dann ein Zählraster gelegt, das die Vergrößerungseffekte durch Objektiv und Kamera berücksichtigend, einer definierten Fläche der Hornhaut entspricht. Mit der so gewonnenen Zellanzahl wird dann die Zellzahl eines Quadratmillimeters der Hornhaut berechnet. Ein solches Zählraster kann man sich relativ einfach durch die Abbildung einer Neubauer Zählkammer unter denselben Beobachtungsbedingungen, die man für die Endothelzellmikroskopie verwendet, erstellen. Die Umrisse einer definierten Fläche werden auf eine Kunststofffolie übertragen und dienen dann als Zählraster für die Endothelzellabbildungen.

Die Zellen dieser definierten Fläche (fixed frame) der Abbildung werden gezählt und die Endothelzelldichte pro Quadratmillimeter errechnet (Anzahl der Zellen im Rahmen/ Fläche des Rahmens in $\text{mm}^2 = \text{Endothelzelldichte} / 1 \text{ mm}^2$). Bei der sogenannten fixed frame Methode befindet sich der Großteil der abgebildeten Endothelzellen innerhalb des Rahmens. Zusätzlich sind zahlreiche Zellen an den Rändern des Rahmens angeschnitten und liegen damit flächenmäßig nur anteilig innerhalb. Um auch die angeschnittenen Zellen bei der Zelldichtebestimmung zu berücksichtigen, werden diese an zwei sich berührenden Rändern gezählt und zu der Anzahl der vollständig innerhalb des Rahmens liegenden Zellen addiert (sogenannte L Methode, Abbildung 4).

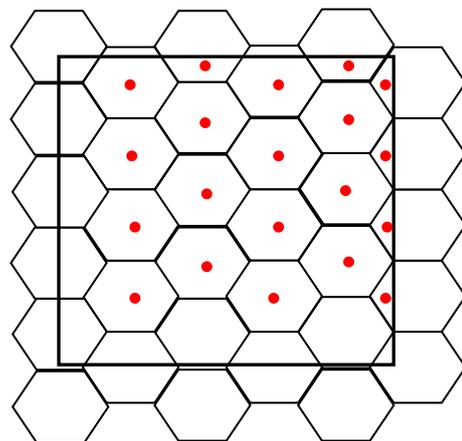


Abb 4.: Manuelle Endothelzellendichtebestimmung mittels fixed frame (links) und L Zählmethode (rechts); eigene Abbildung.

Die Anwendung eines digitalen Bildanalyzesystems erlaubt die Bearbeitung und Zählung von Endothelabbildungen am Computer. Es sind speziellen Programme bzw. Systeme verfügbar, die für diese spezielle Anwendung entwickelt wurden [Reinhard 1999, Gain 2002, Ruggeri 2002].

In der Augenhornhautbank der Universitätsgewebekbank der Charité – Universitätsmedizin wird das Bildanalyseprogramm der Firma Nidek Technologies (Pauda, Italien) verwendet (Abbildung 5).

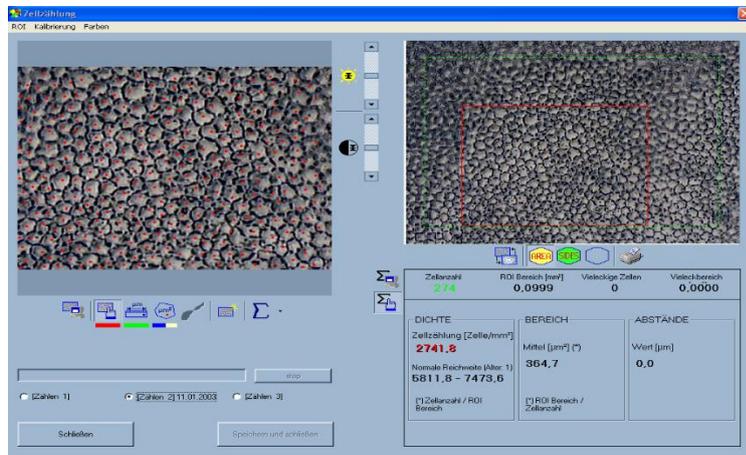


Abb. 5: Digitale Abbildung des phasenkontrastmikroskopischen Endothelzellbildes (200 fache Vergrößerung) im Computerprogramm Navis (Nidek Technologies); eigene Abbildung.

Endothelzellvitalität

Auch wenn die Organkultivierung meiner Einschätzung nach aktuell die beste verfügbare Methode zur Konservierung von Spenderaugenhornhäuten ist, stirbt ein Teil der Endothelzellen, etwa 10 %, dabei ab. Änderungen des Zellstoffwechsels in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der mechanische Stress durch die quellungsbedingte Dickenzunahme des Hornhautstromas mit Faltenbildung der Descemetischen Membran als Basalmembran der Endothelzellen sind hierfür ursächlich. Abgestorbene Endothelzellen lösen sich aus dem Zellverband und nehmen eine kugelige Gestalt an. Diese toten, kugeligen Zellen sind dann über der Endothelzellschicht mikroskopisch erkennbar. Die Endothelzellen können disseminiert über der gesamten Endothelfläche absterben, aber auch größere Areale betreffen. Solche ausgeprägten Nekrosen stellen sich mikroskopisch als konfluierend abgelöster Zellrasen dar. Während die durch Einzelzellnekrosen entstandenen Lücken durch die benachbarten vitalen Endothelzellen geschlossen werden, bleibt bei großflächigen Nekrosen die denudierte Descemetmembran zurück. Häufig finden sich Einzelzellnekrosen vermehrt im Bereich der durch die Quellung der Hornhaut im Kulturmedium entstandenen Descemetfalten.

Das Erkennen von avitalen Zellen lässt sich durch eine Vitalfärbung vereinfachen. Unter Vitalfärbung versteht man dabei die Anfärbung von lebenden Zellen, ohne das

Strukturveränderungen bzw. Schädigungen der Zellen durch die Färbung verursacht werden. Trypanblau hat sich dafür schon lange Zeit bewährt und führt bei membrangeschädigten Zellen und freiliegender Descemetmembran zu deren intensiven Blaufärbung [Pels 1983]. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran bleiben ungefärbt. Die Trypanblaufärbung lässt sich sehr einfach durchführen. Die Spenderaugenhornhaut wird aus der Kultur entnommen, das verbliebene Medium mit einer isotonen Elektrolytlösung (z.B. BSS) abgespült und mit der Endothelseite nach oben auf eine sterile Unterlage (z.B. Gewebekulturschale) gelegt. 1 bis 2 Tropfen einer etwa 0,3 %igen, sterilen, isotonen Trypanblaulösung werden auf die Endothelseite gegeben. Nach etwa 45 Sekunden wird die Hornhaut mit einer sterilen Pinzette am verbliebenen Sklerarand gefasst, der Farbstoff abgeschüttet und die Spenderhornhaut mit einer isotonen Elektrolytlösung gespült, um das verbliebene Trypanblau zu entfernen. Areale zusammenhängender Endothelzellnekrosen und denudierter Descemetmembran wären danach kräftig blau gefärbt und sind bereits mit bloßem Auge erkennbar. Während der Mikroskopie nach Trypanblaufärbung lassen sich Einzelzellnekrose an den blau gefärbten Zellkernen dann sehr leicht erkennen (Abbildung 6).

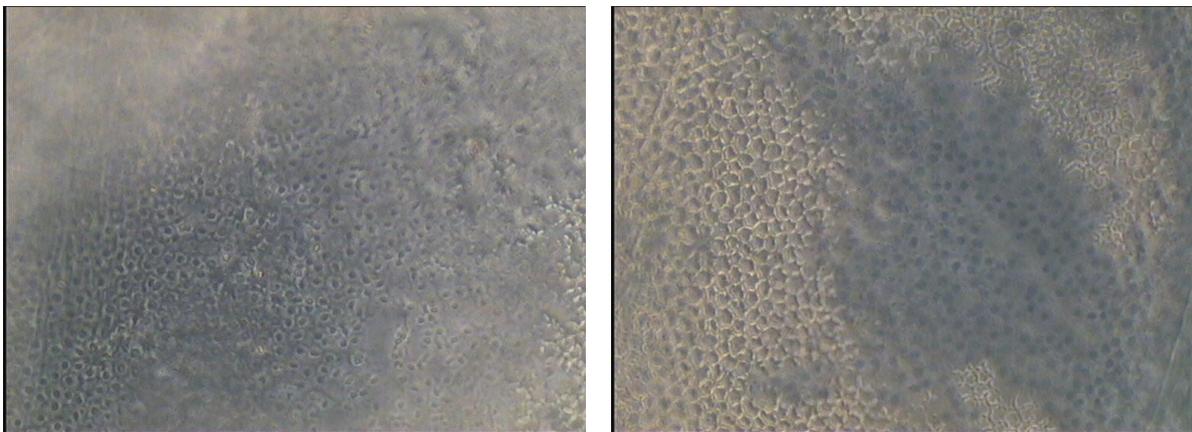


Abb. 6: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links konfluierende nekrotische Endothelzellen, rechts nekrotische (Zellkerne durch Trypanblau intensiv gefärbt) neben intakten Endothelzellen; eigene Abbildung.

Einen einfachen und zuverlässigen Vitalitätstest, der den Zustand der vorhandenen Endothelzellen charakterisiert ohne deren Integrität negativ zu beeinflussen, gibt es bisher nicht. Die gute Stimulierbarkeit der cornealen Endothelzellen durch osmotisch wirksame Substanzen und dadurch deren gute mikroskopische Darstellbarkeit sind daher immer noch die besten Vitalitätszeichen. Lassen sich die Endothelzellen auch durch Verwendung von

hypotonem BSS nicht darstellen, so ist dies daher als schlechtes Zeichen hinsichtlich der Zellvitalität zu bewerten.

Endothelzellnekrosen sind je nach Größe, Lokalisation und Dichte der vitalen Endothelzellen für die Qualität des Augenhornhauttransplantates von Bedeutung. Als Faustregel kann dabei gelten: Je peripherer, je kleiner die Endothelzellschädigung und je höher die Endothelzelldichte, desto unbedeutender ist der Nekrosebereich.

Endothelzellmorphologie

Bei der Beurteilung der Morphologie achtet man routinemäßig auf den Pleomorphismus (Abweichung von der hexagonalen Struktur), den Polymegatismus (unterschiedliche Zellfläche) und die Granulierung / Vakuolisierung der Endothelzellen [Hermel 2017]. Der Zellverlust durch das Absterben einzelner Endothelzellen wird durch Größenzunahme der umliegenden Zellen kompensiert. Diese verlieren ihre hexagonale Struktur, werden eher dreieckförmig und etwa dreimal so groß wie eine normale Endothelzelle. Mit steigendem Zellverlust während der Organkultur nehmen Pleomorphismus und Polymegatismus zu (Abbildung 7).

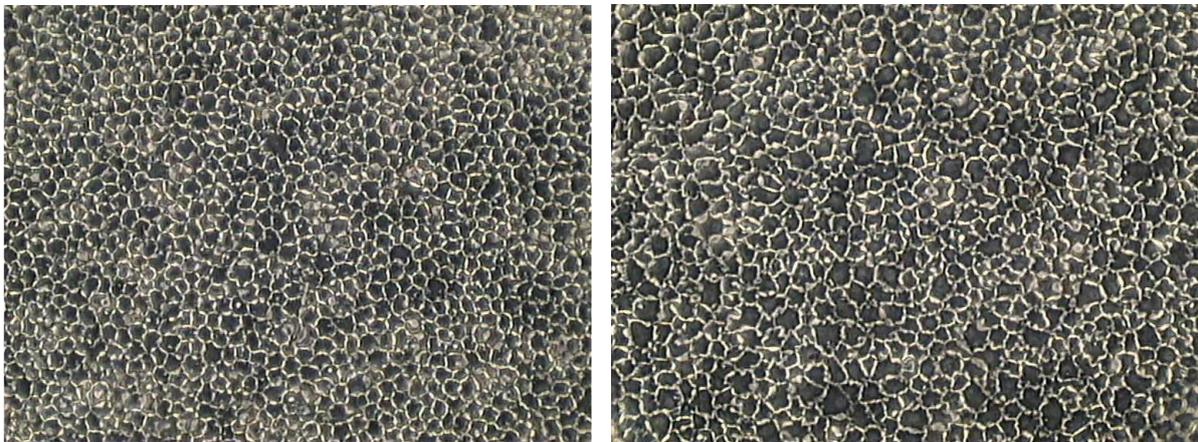


Abb. 7: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links geringer, rechts ausgeprägter Polymegatismus und Pleomorphismus; eigene Abbildung.

Eine verstärkte Granulierung und Vakuolisierung des Endothelzytoplasmas zeigt sich in sehr unterschiedlichem Ausmaß und ist wahrscheinlich Ausdruck einer kritischen Stoffwechsellage. Das Ausmaß der morphologischen Veränderungen der Endothelzellschicht, die auch schon spenderseitig degenerativ erworben wurden (z.B. Guttae), sollte bei der Qualitätsbeurteilung eines Augenhornhauttransplantates berücksichtigt werden (Abbildung 8).

Eine Spenderaugenhornhaut mit einer Endothelzellichte von knapp über 2000 Zellen pro Quadratmillimeter und einem sehr regelmäßigen, hexagonalen Zellbild ist wahrscheinlich von höherer Gute als eines mit gleicher Zelldichte, aber starkem Polymorphismus und ausgeprägt vakuolisierten Endothelzellen. Sicherlich ist die Einschätzung der Endothelzellmorphologie schwierig, subjektiv und kaum standardisierbar. Über die Auswirkung morphologisch veränderter Endothelzellen auf die Transplantatüberlebenszeit existieren keine Untersuchungen, so dass man über deren Bedeutung nur mutmaßen kann.

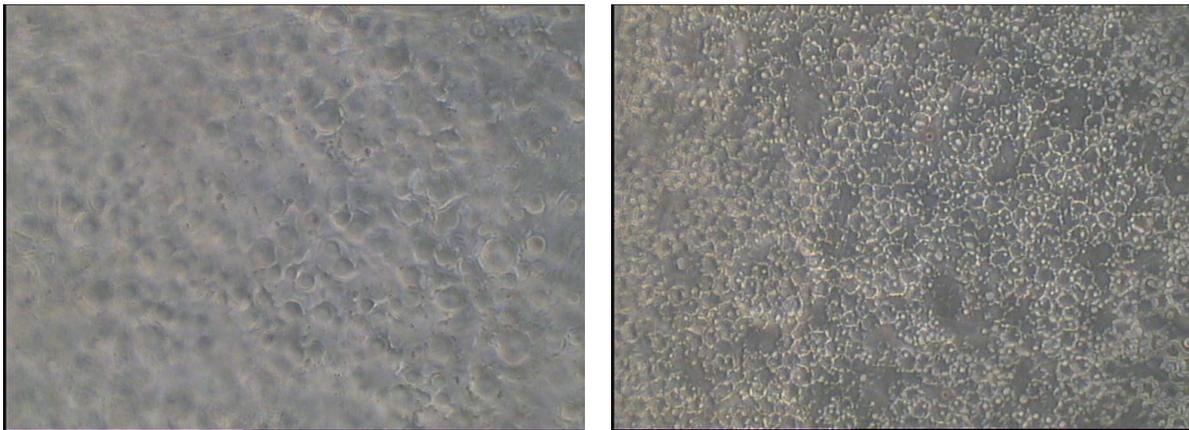


Abb. 8: corneale Endothelzellschicht im phasenkontrastmikroskopischen Bild einer Spenderaugenhornhaut (200 fache Vergrößerung), links zahlreiche Guttae, rechts ausgeprägter Vakuolisierung und Granulierung der Endothelzellen; eigene Abbildung.

2. Eigene Arbeiten

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift umfasst fünf Originalarbeiten, deren Ergebnisse im nachfolgenden kurz zusammengefasst dargestellt werden.

2.1. Automatische Endothelzell-dichtebestimmung bei organkultivierten Spenderaugen-hornhäuten

Die Bestimmung der Endothelzell-dichte von Spenderaugenhornhäuten erfolgt im Organkultursystem über eine Lichtmikroskopie. Um die Endothelzellen mikroskopisch darstellen zu können, ist eine osmotische Stimulierung notwendig. Durch Einbringen der Spenderaugenhornhaut in eine hypotone Lösung nehmen die Endothelzellen in kürzester Zeit Wasser auf und Vergrößern dadurch ihr Volumen. Die Interzellularräume werden mikroskopisch sichtbar und damit die einzelnen Zellen differenzierbar. Über eine stichprobenartige Zählung lässt sich die Endothelzell-dichte pro Quadratmillimeter berechnen. Durch die einlagige Anordnung der Endothelzellen entsteht ein regelmäßiger Wechsel von Endothelzellen und Interzellularräumen (Abbildung 1). Als regelmäßige Abfolge von hellen und dunklen Bildpunkten lässt sich dieses Muster mathematisch umrechnen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die mathematisch berechnete Endothelzell-dichte mit der durch den Untersucher bestimmten Endothelzell-dichte vergleichbar ist. Hierfür wurden 100 organkultivierte Spenderaugenhornhäute in ein dextranhaltiges Entquellungsmedium (Modifiziertes Eagle Medium mit 6% Dextran 500) überführt, deren Endothelzellschicht mikroskopisch dargestellt und diese Abbildungen digitalisiert. Die Endothelzell-dichten wurden von 3 erfahrenen Untersuchern auf jeweils 2 Abbildungen pro Augenhornhaut mit der sogenannten Fixed Frame Methode bestimmt und mit dem Ergebnis der automatischen Berechnung verglichen.

Der Unterschied zwischen manueller und automatisch bestimmter Endothelzell-dichte betrug im Mittel 14 Zellen/mm², entsprechend 0,9% (SD 119 Zellen/mm²). Mit dieser hohen Übereinstimmung der unterschiedlich ermittelten Endothelzell-dichten konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Algorithmus sehr genau ist [Ruggeri 2005].

Ruggeri A, Grisan E, Jaroszewski J. A new system for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. Br J Ophthalmol 2005; 89:306-11.

<https://doi.org/10.1136/bjo.2004.051722>

2.2. Validierung eines Systems zur automatischen Endothelzell-dichtebestimmung bei organokultivierten Spenderaugenhornhäuten

Für den Routineeinsatz einer Bildanalyse-Software zur Bestimmung der Endothelzell-dichte in einer Augenhornhautbank ist deren Verlässlichkeit und Robustheit ein entscheidendes Kriterium. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der entwickelte Algorithmus die Endothelzell-dichte – verglichen mit der Bestimmung durch einen Untersucher als Goldstandard – ausreichend genau bestimmt, wurde untersucht, ob die automatische Bestimmung der Endothelzell-dichte anhand verschiedener Bilder zu vergleichbar guten Ergebnissen führt. Bei 200 Spenderaugenhornhäuten wurden zahlreiche mikroskopische Endothelabbildungen angefertigt und digitalisiert. Die automatische Analyse von insgesamt 1536 Bildern ergab im Mittel eine Abweichung von 45 Zellen/mm² (SD 99 Zellen/mm²) zur manuell bestimmten Zell-dichte. Die automatische Analyse der Endothelzell-dichte verschiedener Endothelabbildungen derselben Spenderaugenhornhaut ergab im Mittel eine Abweichung von 62 Zellen/mm² (SD 30 Zellen/mm²). Alle automatisch errechneten Zell-dichten waren damit ausreichend verlässlich und robust [Ruggeri 2007].

Ruggeri A, Grisan E, Schroeter J. Evaluation of repeatability for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:1213-1215.

<https://doi.org/10.1136/bjo.2006.112763>

2.3. Der Einfluss osmotisch stimulierender Lösungen auf die Endothelzelldichte

Zur Visualisierung und damit zur lichtmikroskopischen Darstellung von cornealen Endothelzellen ist eine osmotische Stimulierung mit hypoosmolaren Substanzen unverzichtbar. Etabliert und im alltäglichen Einsatz in Augenhornhautbanken sind dabei 2 Lösungen. Eine hypotone Balanced Salt Solution (BSS), die in isotoner, physiologischer Form in der Ophthalmochirurgie eingesetzt wird, und eine Saccharoselösung, üblicherweise in einer 1,8%igen Konzentration in destilliertem Wasser.

In der nachfolgenden Arbeit wurde untersucht, ob diese 2 Lösungen einen negativen Einfluss auf die cornealen Endothelzellen haben. Gut vorstellbar ist, dass es durch das Einströmen von Wasser in die Endothelzellen zum Elektrolytausgleich in hypotoner Umgebung zu einer irreversiblen Schädigung der Zellintegrität kommt. Eine Zeit- und Osmolaritätsabhängigkeit scheint dabei sehr wahrscheinlich zu sein.

Die Untersuchungen erfolgten an einem Schweineaugenhornhautmodell. Die Augenhornhaut von Schweinen ist dafür gut geeignet, da diese strukturell im Vergleich zur menschlichen Hornhaut identisch ist und ebenfalls die Besonderheit einer postpartal nicht mehr vorhandenen Mitosefähigkeit der Endothelzellen aufweist. Im Paarvergleich ist eine intraindividuelle Kontrolle möglich, die auch bei kleinen Fallzahlen eine Veränderung der Endothelzelldichte sicher erkennen lässt.

Jeweils eine Augenhornhaut wurde für 4 Minuten mit hypotoner BSS Lösung oder mit 1,8%iger Saccharoselösung behandelt. Die jeweilige Partneraugenhornhaut wurde als Kontrolle verwendet. Nach der Behandlung wurden die Augenhornhäute für 48 Stunden organkultiviert, um regenerative Prozesse zu ermöglichen. Sterben Endothelzellen als Folge dieser Behandlung ab, so verlassen sie den Zellverband und die entstehenden Lücken werden durch die benachbarten Endothelzellen durch deren Migration geschlossen. Dadurch kommt es zu einer Größenzunahme der verbliebenen Endothelzellen und als Folge zu einer Abnahme der Endothelzelldichte. Durch eine Anfärbung der Endothelzellschicht mit 0,2% igem Alizarinrot wurden die Zellen anschließend visualisiert und deren Dichte mit einem manuellen Zählverfahren in 3 Stichproben pro Augenhornhaut bestimmt. Um den gesamten Prozess der Organkultivierung abzubilden wurde dextranfreies und dextranhaltiges Medium verwendet. In der Saccharose-Gruppe zeigte sich ein statistisch und auch klinisch relevanter Endothelzellverlust vom im Mittel 9 bzw. 11%. Die hypotone BSS Lösung hatte keinen Einfluss auf die Endothelzelldichte.

Es konnte in dieser Untersuchung eindeutig und erstmalig gezeigt werden, dass die Saccharoselösung als deutlich stärker hypoosmolare Substanz zweifelsfrei einen negativen Einfluss über 4 Minuten, ein üblicher Zeitrahmen für eine Endothelzellmikroskopie, auf die Endothelzellen hat und zum Absterben etwa jeder 10. Endothelzelle führt [Meltendorf 2007].

Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P, Schroeter J. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 143-147.

<https://doi.org/10.1007/s00417-006-0334-2>

2.4. Der Einfluss von hypothermen Temperaturen auf die Endothelzellen

Während der Lagerung, des Transportes und dem Zeitraum vor der Transplantation kommt es zu einem unvermeidbaren Absinken der Umgebungstemperatur von organkultivierten Spenderaugenhornhäuten. Während der Organkultivierung befinden sich die Spenderaugenhornhäute im Wärme- bzw. Brutschrank in einer Umgebungstemperatur von 31 bis 36°C. Für Manipulationen werden die Spenderaugenhornhäute aus dieser Umgebung genommen und z.B. üblicherweise mit raumtemperierter hypotoner BSS Lösung mikroskopisch untersucht. Spätestens mit dem Versand von der Augenhornhautbank zur Augenklinik, in der die Transplantation stattfindet, ist die Umgebungstemperatur deutlich unter 30°C.

In der nachfolgenden Arbeit wurde der Einfluss von niedrigen Temperaturen auf das corneale Endothel mit dem etablierten und oben beschriebenen Schweineaugenhornhautmodell untersucht. Dabei wurden die Augenhornhäute im Paarvergleich in Organkulturmedium (MEM mit 6% Dextran 500) für 12 Stunden bei 4°C und für 48 Stunden bei 21°C inkubiert. Anschließend wurde die Organkultur für 48 Stunden bei 32°C fortgesetzt und die Endothelzelldichte über eine manuelle Zellzählung nach Alizarinrotfärbung bestimmt.

Beide Temperaturen führten zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Endothelzelldichte. Diese lag in der 4°C Gruppe bei 0,3% und in der 21°C Gruppe bei 1,8%. Das Absinken der Umgebungstemperatur von organkultivierten Spenderaugenhornhäuten bis in einen Bereich von 4°C scheint unkritisch zu sein [Schroeter 2008].

Schroeter J, Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P. Influence of temporary hypothermia on corneal endothelial cell density during organ culture preservation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008; 246: 369-372.

<https://doi.org/10.1007/s00417-007-0711-5>

2.5. Der Einfluss von hyperthermen Temperaturen auf die Endothelzellen

Während niedrige Umgebungstemperaturen bei organkultivierten Spenderaugenhornhäuten unvermeidbar sind, kommen höhere Temperaturen eigentlich nur ungewollt vor. Insbesondere beim Transport von Spenderaugenhornhäuten besteht die Gefahr, dass die Umgebungstemperatur deutlich über 36°C liegt.

Um die Toleranz der cornealen Endothelzellen auf höhere Temperaturen zu untersuchen, wurden, wie in der nachfolgenden Arbeit ausführlich dargestellt, Schweineaugenhornhäute mit dem bekannten und etablierten Modell nach 24 Stunden Organkultur in dextranhaltigem MEM für 12 Stunden jeweils 40°C, 42°C, 44°C und 50°C exponiert. Nach 48 Stunden weiterer Organkultivierung bei 32°C wurde die Endothelzelldichte über eine manuelle Zellzählung nach Alizarinrotfärbung bestimmt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Während es bei der 40°C und der 42°C Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied der Endothelzellichten gab, führten 44°C und 50°C zu einer kompletten Nekrose der kompletten Endothelzellschicht. Die Toleranz höherer Umgebungstemperaturen endet folglich klar bei 42°C [Schroeter 2015].

Schroeter J, Ruggeri A, Thieme H, Meltendorf C. Impact of temporary hyperthermia on corneal endothelial cell survival during organ culture preservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 235:753-758.

<https://doi.org/10.1007/s00417-014-2903-0>

3. Diskussion

Die Dichte der cornealen Endothelzellen von Spenderaugenhornhäuten ist zweifelsfrei ein kritischer Parameter, der wesentlich für deren Eignung zur Transplantation ist. Insbesondere bei den zunehmend durchgeführten hinteren lamellären Hornhauttransplantationen, wie z.B. bei der Descemetmembran-Endothel-Keratoplastik (DMEK), ist eine ausreichend hohe Endothelzellendichte wichtig für den klinischen Erfolg [Oellerich 2020]. Die Organkultur, der in Europa etablierte Standard zur Kultivierung von Spenderaugenhornhäuten, ermöglicht zwar regenerative Prozesse, dennoch beeinflussen verschiedene Faktoren die Endothelzellendichte. Entscheidend für die Beurteilung der Endothelzellendichte ist deren Bestimmung. Meiner Einschätzung nach ist die Art und Weise der Endothelzellevaluation der wesentlichste Einflussfaktor. Eine mikroskopische Beurteilung in möglichst kurzem Zeitabstand zur Transplantation ist durchaus von Relevanz. 2006 zeigten Builles et al. in einer Analyse von 1992 humanen Spenderaugenhornhäuten über 4 Jahre, dass bei 1,9% pro Jahr die Endothelzellendichte so stark abnahm, dass es, ohne eine wiederholte Evaluation am Ende der Organkulturperiode, zu einem primären Transplantatversagen gekommen wäre [Builles 2006]. Eine Ursache für diesen ausgeprägten Endothelzellverlust konnten die Autoren nicht feststellen. Neben der Notwendigkeit einer Endothelzellbeurteilung am Ende der Organkulturperiode spielt die Durchführung der mikroskopischen Untersuchung und die Beurteilung der gewonnenen Bilder eine wesentliche Rolle. Die Auswertung der mikroskopischen Endothelzellbilder erfolgt üblicherweise durch die subjektive Einschätzung des Untersuchers in Kombination mit einer stichprobenartigen Zählung der Endothelzellen in einem selbst gewählten Areal. Das Ergebnis dieser Stichprobe wird dann verwendet, um die Endothelzellendichte von einem Quadratmillimeter zu berechnen. Diese Analysemethode wird als manuelle Auswertung bezeichnet und ist die am häufigsten angewendete Technik der Endothelzellendichtebestimmung. 2003 veröffentlichten Thuret et al. die Ergebnisse einer Umfrage zur dieser manuellen Endothelzellanalysemethode [Thuret 2003]. Als Hauptgrund für variable Ergebnisse zwischen den verschiedenen Augenhornhautbanken wurde eine oft fehlende Kalibrierung der mikroskopischen Abbildungen identifiziert. Ist die abgebildete Fläche eigentlich größer als angenommen, führt dies zu einer signifikanten falsch hohen Endothelzellendichte. Aber auch unterschiedliche Zählstrategien, die Auswertung nur kleiner Flächen und die unterschiedliche Erfahrung der beurteilenden Personen konnte diese Untersuchung als Fehlerquellen identifizieren. Nicht zuletzt ist es eine verbreitete Technik, die

Spenderaugenhornhaut durch das Okular des Mikroskops für einen kurzen Zeitraum zu beobachten, ohne Bilder für eine weitergehende Analyse anzufertigen. Mit Hilfe eines im Okular vorhandenes Raster wird dann die Endothelzelldichte bestimmt.

In einer nachfolgend durchgeführten Studie von Thuret et al. wurden Endothelzellpräparate mit bekannter und valide bestimmter Zelldichte in den verschiedenen Augenhornhautbanken in Frankreich analysiert [Thuret 2004]. Etwa die Hälfte der erfolgten Befundungen, die in den Banken mit den dortigen Routinemethoden erfolgten, ergaben eine Abweichung von mehr als zehn Prozent verglichen mit der echten Endothelzelldichte. In 33% wurde die Endothelzelldichte falsch zu hoch und in 26% falsch zu niedrig bewertet. Die Abweichungen lagen bis zu 82% über und bis zu 42% unter der wahren Endothelzelldichte. Damit war erstmalig wissenschaftlich eine relevante Varianz bei der Bestimmung der cornealen Endothelzelldichte in Augenhornhautbanken gezeigt worden, eine Tatsache die erfahrenen Augenhornhautbankmitarbeitern schon lange bewusst war. Als Konsequenz ihrer Untersuchungen entwickelte die Arbeitsgruppe um Gilles Thuret und Philippe Gain ein Computerprogramm für die automatisierte Endothelzellanalyse [Gain 2002]. Auch wenn mit diesem System die Endothelzellerkennung automatisiert ermöglicht wurde, hatte der Untersucher das Areal auf dem Endothelzellbild auszuwählen. Der Ansatz der von uns entwickelten und validierten Endothelzellanalysesoftware war eine völlig automatisierte, untersucherunabhängige Bestimmung der Endothelzelldichte. Mit der Aufnahme des Bildes in einer relativ niedrigen Vergrößerung erfolgt in etwa 1 Sekunde die zuverlässige Endothelzelldichtebestimmung [Ruggeri 2005]. Dieser Algorithmus benötigt eine relativ große Fläche mit einer guten Erkennbarkeit der einzelnen Zellgrenzen. Nur dann ermittelt er eine Endothelzelldichte. Bei Abbildungen mit schlechter Bildqualität wird keine Zelldichte ermittelt. Die mittlere Differenz der automatisch ermittelten Zelldichte verglichen mit einer manuellen Auswertung war mit 14 Zellen/mm² (SD ± 119 14 Zellen/mm²) sehr gering [Ruggeri 2007]. Für die Routineanwendung dieser Bildanalysesoftware kann die Notwendigkeit einer guten Abbildungsqualität in einem relativ großen Bereich als nachteilig angesehen werden. Durch Veränderungen der Spenderaugenhornhaut während der Organkultivierung, z.B. bei postmortaler Quellung oder noch nicht ausreichender Entquellung am Ende der Organkultivierung, ist es häufig nicht möglich, eine Endothelabbildung zu generieren, die die Zuverlässigkeitskriterien der Software nach Analyse erfüllt. In solchen Fällen ist mit diesem vollautomatischen Ansatz keine Endothelzellbestimmung möglich.

Andere Bildanalyseprogramme, die nur einen frei wählbaren, kleinen Bereich mit gut erkennbaren Endothelzellen benötigen, ermöglichen auch bei reduzierter Abbildungsqualität eine Zelldichtebestimmung, aber mit dem Nachteil einer hohen Untersucherabhängigkeit [Deb-Joardar 2007]. In der Routine der meisten Augenhornhautbanken werden daher Bildanalyzesysteme verwendet, die mikroskopische Bilder speichern und eine computerbasierte, rein manuelle Endothelzelldichtebestimmung ermöglichen [Reinhard 1999].

Aus meiner Sicht wäre es weiterhin anzustreben, eine Methode der Endothelzelldichtebestimmung zu entwickeln, die eine geringe Untersucherabhängigkeit bei zuverlässigen Ergebnissen aufweist. Nach einer zwingend notwendigen Kalibrierung des Mikroskop-Software-Systems würde man die zahlreichen Fehlermöglichkeiten einer manuellen Auswertung vermeiden [Campolmi 2014].

Die sogenannte Organkultivierung von Spenderaugenhornhäuten, eine Aufbewahrung in einem optimierten Zellkulturmedium bei Temperaturen zwischen + 32 und + 36°C unter sterilen Bedingungen, ist in den meisten europäischen Ländern als Standard fest etabliert. Neben den Vorteilen wie regenerativen Prozessen und der Detektion eventuell vorhandener mikrobiologischer Kontaminationen kommt es aber zu einem Verlust an Endothelzellen, am ehesten dadurch, dass das Gewebe nur eingeschränkt physiologischen Bedingungen ausgesetzt ist [Pels 2008]. Auch spenderbezogene Faktoren wurden diskutiert und untersucht. Hinsichtlich des Spenderalters verglichen Gain et al. den Endothelzellverlust von Spendern älter als Jahre 85 mit dem jüngeren Spender [Gain 2002]. Hierbei stellten sie fest, dass eine initial geringere Dichte an Endothelzellen nach einer Organkultur von $13,1 \pm 4$ Tagen keinen signifikanten Unterschied mehr erkennen ließ, da die Endothelzelldichte in der Organkultur bei den jüngeren Spenderhornhäuten schneller abnahm. Ist initial eine ausreichende Zelldichte vorhanden, so spielt das Spenderalter keine signifikante Rolle. Eine geringere Endothelzelldichte findet sich bei Augenhornhäuten von Spendern nach erfolgter Kataraktoperation, ohne Abhängigkeit vom Alter [Pilger 2020].

Grabska-Liberek et al. untersuchten in einer groß angelegten Vergleichsstudie zwischen 1996 und 2002 die Faktoren Spenderalter, Todesursache, Zeitraum zwischen Tod und Konservierung und die Dauer der Kultur bezüglich ihrer Auswirkung auf die Qualität des Endothels [Grabska-Liberek 2003]. Sie konnten zeigen, dass sich eine kürzere post mortem Zeit positiv auf die Qualität des Endothels auswirkt. Der Zellverlust nahm nach Kultivierung

länger als 7 Tage zu. Dieser Sachverhalt zeigte sich unabhängig von den anderen Faktoren. Das Alter der Spender konnte passend zu den Ergebnissen von Gain et al. hingegen als wesentlicher Einflussfaktor auf die Endothelzelldichte organkultivierter Spenderaugenhornhäute ausgeschlossen werden.

Bezüglich der Todesursache des Spenders gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Redbrake et al. untersuchten unterschiedliche Todesursachen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Endothelzelldichte und energetische Gesichtspunkte [Redbrake 1997]. Sie konnten zeigen, dass nach der Organkultur keine signifikanten Unterschiede der Endothelzelldichte zu beobachten waren. Spelsberg et al. fanden passend hierzu keinen Einfluss einer beim Spender bestehenden Septikämie die Endothelzelldichte der Spenderaugenhornhaut [Spelsberg 2002]. Für die Spendergewinnung lässt sich aus den vorliegenden wissenschaftlichen Daten ableiten, dass bei höherem Lebensalter und nach erfolgter Kataraktoperation mit einer geringeren cornealen Endothelzelldichte zu rechnen ist. In der Praxis kann man jedoch vor dem Hintergrund eines weiterhin bestehenden Mangels an Augenhornhauttransplantaten nicht völlig auf diese Spendergruppen verzichten [Pilger 2020].

Aufgrund einer Quellung der Spenderaugenhornhäute mit relevanter Stromadickenzunahme während der Organkultur erfolgt wenige Tage vor der geplanten Transplantation ein Wechsel in ein hyperosmotisches Zellkulturmedium mit Dextranzusatz. Ungünstiger Weise hat dieses dextranhaltige Medium einen eher negativen Einfluss auf die Endothelzelldichte.

So berichten Pels et al. in einer prospektiven Studie an 137 Hornhäuten über unterschiedliche Zeiträume, dass bei einer Lagerung in Medium mit 6 % Dextran nach 1-2 Tagen ein signifikant geringerer Zellschaden nachzuweisen ist als bei einer Lagerung über 3-4 Tage [Pels 1984]. Borderie et al. untersuchten 20 humane Augenhornhäute nach 20 tägiger Lagerung in normalem Kulturmedium mit anschließender Lagerung für 1-4 Tage in dextranhaltigem Medium auf Zellschäden [Borderie 1997]. Während der Entquellungsphase konnte hier ein statistisch signifikanter Zellverlust von 8.4 % festgestellt werden. Jedoch blieb die Endothelzellschicht als solche intakt.

Durch eine verbesserte Visualisierbarkeit der Endothelzellen nach einer Entquellung in dextranhaltigem Organkulturmedium könnte auch eine bessere Bestimmbarkeit der Endothelzelldichte die in den Arbeiten gefundene negative Differenz beeinflusst haben. Die eigenen Erfahrungen über mehr als 2 Jahrzehnte und die Befundung tausender Spenderaugenhornhäute lassen keinen Zweifel daran, dass nicht selten nach Entquellung im

dextranhaltigen Medium eine höhere Endothelzelldichte verglichen mit davor bestimmt wird. Dennoch ist es aufgrund der möglichen negativen Effekte des Dextrans auf die Endothelzellen ein möglichst kurzes Zeitintervall der Exposition vor Transplantation sinnvoll. Durch die isolierte Descemetmembran-Endothel-Keratoplastik (DMEK) ist es grundsätzlich auch möglich, auf eine Entquellung zu verzichten, da der stromale Teil nicht transplantiert wird [Salla 2019, Rickmann 2022].

Für alle Evaluierungsmethoden der Endothelzelldichte organkultivierter Spenderaugenhornhäute, seien sie rein visuell oder auch aufwändig computerbasiert, ist eine Stimulierung mit einer hypoosmolaren Lösung notwendig, da ansonsten die Zellgrenzen mittels Lichtmikroskopie nicht erkennbar sind. In der hypoosmolaren Lösung nehmen die Endothelzellen Wasser auf und dadurch an Volumen zu. Sie können sich aufgrund ihrer mikromorphologischen Anordnung nur zur stromaabgewandten Seite ausdehnen, was zu einer Vergrößerung der interzellulären Räume führt und dadurch die Grenzen der einzelnen Zellen unterscheidbar macht. Es existiert kein einheitliches Protokoll für diese osmotische Stimulation im Rahmen einer lichtmikroskopischen Untersuchung, weder hinsichtlich der Dauer, noch der Osmolarität der verwendeten Lösung. In unserer Untersuchung konnten wir nachweisen, dass eine 4-minütige Exposition in einer hypotonen BSS Lösung keinen Effekt auf die Endothelzelldichte hatte. Dieselbe Expositionszeit in einer stärker hypoosmolaren Saccharoselöung, die in vielen Augenhornhautbanken routinemäßig verwendet wird, führte zu einem Endothelzellverlust von 9 bzw. 11% [Meltendorf 2007]. Damit hat die Augenhornhautbank eine Möglichkeit, die Endothelzelldichte bei deren unverzichtbaren mikroskopischen Evaluation zu schützen. Die verwendete hypoosmolare Lösung sollte so nah am isotonen Wert wie möglich und die Expositionszeit so kurz wie möglich sein.

Der Einfluss einer Änderung der Umgebungstemperatur auf die Endothelzelldichte organkultivierter Spenderaugenhornhäute, wie sie z.B. bei Manipulationen in der Augenhornhautbank aber auch beim Transport der Augenhornhauttransplantate zum Operateur auftreten können, wurde wenig untersucht. Unsere Untersuchungen hierzu ergaben keine Hinweise darauf, dass Temperaturen zwischen +4 und +42°C zu einem Verlust an Endothelzellen führen [Schroeter 2008, Schroeter 2015]. Dieses Wissen um sichere Expositionstemperaturen von organkultivierten Spenderaugenhornhäuten ist von großem Nutzen für Augenhornhautbanken, die durch strukturelle Änderungen zunehmend

überregional eine Versorgung mit Augenhornhauttransplantaten sicherstellen [Reinshagen 2023].

Für unsere Untersuchungen etablierten wir ein Modell mit Schweineaugenhornhäuten. Diese wurden gepaart untersucht, wobei immer eine Augenhornhaut eines Tieres als Kontrolle diente und die andere behandelt wurde. Durch die intraindividuell sehr ähnliche Endothelzelldichte lassen sich externe Effekte auf die Zellvitalität der behandelten Augenhornhaut auch bei kleiner Gruppengröße sicher erkennen [Jacobsen 1985]. Wir nutzten die zentrale Endothelzelldichte als Messwert unter der Annahme, dass Endothelzellschäden, die zu einem Zellverlust führen, durch kompensatorische Größenzunahme und Migration benachbarten Zellen führen, und nicht durch Mitosen. Diese regenerativen Vorgänge bedingen dann eine Abnahme der Endothelzelldichte, die durch eine standardisierte Zellzählung erfasst werden kann [Armatage 1997, Hagenah 1993, Singh 1984]. Um eine Zellmigration aus dem Randbereich der Augenhornhaut, der physiologisch eine höhere Zelldichte aufweist, zu verhindern, die eine passagere Abnahme der zentralen Endothelzelldichte kompensieren könnte, wurde der zentrale Bereich isoliert und nur dieser für die Untersuchungen genutzt. Nach der Behandlung wurden die zentralen Augenhornhautstücke für mindestens 48 Stunden im Organkulturmodell kultiviert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass regenerativen Veränderungen stattfinden können. Die Augenhornhäute von Schweinen sind physiologisch denen des Menschen sehr ähnlich. Wir sind daher davon überzeugt, dass sich die Ergebnisse unserer Studien auf humane Augenhornhäute übertragen lassen. Die Verwendung humaner Spenderaugenhornhäute ist nicht nur aus ethischen Gründen vor dem Hintergrund eines Mangels an Spenderaugenhornhäuten schwierig. Der größere intraindividuelle Unterschied der Endothelzelldichte von menschlichen Augenhornhäuten würde eine deutlich größere Gruppengröße und damit eine deutlich höhere Anzahl an zu untersuchenden Augenhornhäuten notwendig machen, um Unterschiede erkennen zu können. Außerdem lassen sich durch das identische Alter und eine gleiche postmortale Zeit bei gesunden Schweinen diese Einflußfaktoren auf die corneale Endothelzelldichte ausschließen, was zu einer hohen Standardisierung des Untersuchungsmodells beiträgt. Die Bestimmung der Endothelzelldichte erfolgte mit einem kalibrierten computerbasierten Analysesystem (Navis, Nidek Technologies, Padua, Italien). Für die optimale Visualisierung der Endothelzellen erfolgte eine Färbung der Zellmembranen mit Alizarinrot [Singh 1985, Sperling 1978, Taylor

1981]. Die Zählung der Endothelzellen erfolgte auf 3 nicht überlappenden Arealen, von denen eine digitale Abbildung erstellt wurde. Diese Bilder wurden dann von 2 erfahrenen Untersuchern mittels fixed frame Methode computerunterstützt manuell ausgewertet und die Endothelzellichten so bestimmt. Durch diese große Anzahl an Endothelzellzählungen sollte der Einfluss einer variablen Endothelzellichte der einzelnen zentralen Augenhornhaut reduziert werden. Auch wenn die Standardabweichung der einzelnen Endothelzellichten pro Augenhornhautprobe gering waren, lässt sich ein Einfluss durch die Auswahl der Zählareale nicht ausschließen. Die gefundenen Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppen waren so deutlich signifikant, dass wir diesen möglichen Einfluss für sehr gering halten.

Aus dem bisher dargestellten Wissen über Einflussfaktoren auf die Endothelzellichte organkultivierter Spenderaugenhornhäute lässt sich ableiten, dass die Organkultur, auch wenn sie der aktuelle Goldstandard ist, noch nicht optimal für den Erhalt der Transplantierbarkeit dieser ist. Neuere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass durch die Kultivierung in einem Bioreaktor, der epitheliale und endotheliale Seite der Spenderaugenhornhaut trennt und einen physiologischen Druckgradienten unter permanentem Mediaustausch ermöglicht, der Endothelzellverlust um im Durchschnitt 23% verringert werden kann. Außerdem wurde eine 4 fach höhere Aktivität der Na^+/K^+ ATPase der Endothelzellen gefunden, was für deren besseren Funktion spricht. Zusätzlich kommt es in diesem aktiven Kultivierungssystem zu keiner Stromaquellung, so dass auf eine Dextranexposition verzichtet werden kann [Garcin 2019 und 2020]. Außerdem kann die Endothelzellevaluation in diesem geschlossenen System mit einem Spiegelmikroskop erfolgen, vergleichbar mit der Untersuchung der cornealen Endothelzellschicht von Patientenaugen. Eine Exposition der Spenderaugenhornhaut gegenüber hypoosmolarer Substanzen ist damit nicht notwendig [Garcin 2022]. Diese aktive Organkultivierungsmethode hat damit entscheidende Vorteile durch die Vermeidung potentiell negativer Einflüsse auf die Endothelzellichte der Spenderaugenhornhäute. Es besteht begründete Hoffnung, dass es mit dieser aktiven Kultivierungsmethode zu einer relevanten Evolution der seit 50 Jahren etablierten passiven Organkultivierung von Spenderaugenhornhäuten in naher Zukunft kommt.

4. Zusammenfassung

Neben spenderabhängigen Einflussfaktoren und einem unvermeidbaren Endothelzellverlust im Rahmen einer passiven Organkultivierung, auch wenn diese aktuell den Goldstandard darstellt, hat die Augenhornhautbank Einfluss auf die Endothelzelldichte von Augenhornhäuten.

Die fehleranfällige Bestimmung der cornealen Endothelzelldichte von Spenderaugenhornhäuten lässt sich durch eine computerbasierte Analyse zweifelsfrei positiv beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass die entwickelte Bildanalysesoftware vollautomatisch valide und reproduzierbar die zentrale Endothelzelldichte bestimmt.

Unsere Untersuchungen fanden einen relevanten Endothelzellverlust durch die Verwendung einer stärker hypoosmolaren Substanz für die lichtmikroskopische Visualisierung dieser Zellen. Durch die Verwendung einer möglichst gering hypoosmolaren Substanz mit einer niedrigen Expositionszeit kann die Endothelzellschicht im Rahmen der Organkultivierung von Spenderaugenhornhäuten geschützt werden.

Hypothermie und hypertherme Temperaturänderungen zeigten in unseren Arbeiten in einem Bereich zwischen +4 und +42°C keinen Effekt auf die cornealen Endothelzellen von organkultivierten Augenhornhäuten. Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes und über +42°C müssen, z.B. während des Transportes von Augenhornhauttransplantaten zum Empfänger, streng vermieden werden, da ansonsten eine komplette Nekrose der empfindlichen Endothelzellschicht eintritt.

Die aktuellen Forschungen zu einer aktiven Organkultivierungsform von Spenderaugenhornhäuten ergaben vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer Protektion der Endothelzellen. Dabei muss auf die bekannten positiven Effekte der etablierten Organkultur nicht verzichtet werden. Sollte sich dieser Ansatz erfolgreich in die Routine etablieren lassen, wird es voraussichtlich zu einer echten Evolution der Konservierung von Spenderaugenhornhäuten kommen.

5. Literaturangaben

1. Armitage WJ, Easty DL (1997) Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(1):16–24
2. Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L. Cornea. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. 1997 Mar;16(2):215-23.
3. Bourne WM, Doughman DJ, Lindstrom RL. Organ-cultured corneal endothelium in vivo. *Arch Ophthalmol* 1977;95:1818-1819.
4. Bundesgesetzblatt. Verordnung über die Anforderungen an Qualität und Sicherheit der Entnahme von Geweben und deren Übertragung nach dem Transplantationsgesetz (TPG-Gewebeverordnung - TPG-GewV). Fassung vom 26.März 2008; BGBl. I 1998: 512.
5. Bundesgesetzblatt. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz - TPG). Fassung vom 19.Oktober 2012;BGBl. I 2012: 192.
6. Bundesärztekammer. Richtlinie zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank, Erste Fortschreibung. *Deutsches Ärzteblatt*. DOI:0.3238/arztebl.2018.rl_augenhornhautbank_02
7. Campolmi N, Acquart S, He Z, Gavet Y, Jullienne R, Naigeon N, Bernard A, Forest F, Péoc'h M, Thuret G, Gain P. Inherent errors of the fixed-frame counting method for corneal endothelial cell density in eye banks. *Cell Tissue Bank*. 2014 Sep;15(3):451-9. doi: 10.1007/s10561-013-9411-z.
8. Capella JA, Kaufman HE. Human corneal endothelium. I. Normal morphology. *Doc Ophthalmol*. 1969;26:1-8. doi: 10.1007/BF00943957.
9. Culbertson WW, Abbott RL, Forster RK. Endothelial cell loss in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1982 Jun;89(6):600-4. doi: 10.1016/s0161-6420(82)34754-5.
10. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 May;48(5):2062-7. doi: 10.1167/iovs.06-1043.
11. Doughman DJ, Van Horn D, Harris JE, Miller GE, Lindstrom R, Good RA. The ultrastructure of human organ-cultured cornea. I. Endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1974 Dec;92(6):516-23. doi: 10.1001/archophth.1974.01010010530015
12. Ehlers N. Cornea in organ culture. *Curr Opin Ophthalmol*. 1990 Aug;1(4):354-9.
13. European Union: Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, 7.4.2004;102: 48-58.

14. European Union: Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. Official Journal of the European Union, 9.2.2006; 38: 40-52.
15. European Union: Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. Official Journal of the European Union, 25.10.2006; 294: 32-50.
16. Filatov VP. Transplantation of the cornea from preserved cadavers' eyes. *Lancet* 1937;i:395-397.
17. Flockerzi E, Turner C, Seitz B, Collaborators GSG; GeKeR Study Group. 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. *Br J Ophthalmol*. 2023 Aug 16;bjo-2022-323162. doi: 10.1136/bjo-2022-323162.
18. Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, Reinhard T, Geerling G, Torun N, Seitz B; all German Keratoplasty Registry Contributors. Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG-Section Cornea and its Keratoplasty Registry. *Am J Ophthalmol*. 2018 Apr;188:91-98. doi: 0.1016/j.ajo.2018.01.018.
19. Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos L. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol*. 2002 Jul;86(7):801-8. doi: 10.1136/bjo.86.7.801.
20. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Rizzi P, Pugniet JL, Acquart S, Colpart JJ, Le Petit JC, Maugery. Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *J.Br J Ophthalmol*. 2002 Apr;86(4):404-11. doi: 10.1136/bjo.86.4.404.
21. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Gavet Y, Turc P H, Théillère C, Acquart S, Le Petit J C, Maugery J, Campos L. Automated analyser of organ cultured corneal endothelial mosaic. *J Fr Ophtalmol*. 2002 May;25(5):462-7.
22. Garcin T, Gauthier AS, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Perrache C, Acquart S, Cognasse F, Forest F, Thuret G, Gain P. Innovative corneal active storage machine for long-term eye banking. *Am J Transplant*. 2019 Jun;19(6):1641-1651. doi: 10.1111/ajt.15238.
23. Garcin T, Gauthier AS, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Perrache C, Acquart S, Cognasse F, Forest F, Gain P, Thuret G. Three-month Storage of Human Corneas in an Active Storage Machine. *Transplantation*. 2020 Jun;104(6):1159-1165. doi: 10.1097/TP.0000000000003109.

24. Garcin T, Crouzet E, Perrache C, Lepine T, Gain P, Thuret G.J Specular Microscopy of Human Corneas Stored in an Active Storage Machine. *Clin Med.* 2022 May 26;11(11):3000. doi: 10.3390/jcm11113000.
25. Grabska-Liberek I, Szaflik J, Brix-Warzecha M. The importance of various factors relating to the morphological quality of corneas used for PKP by the Warsaw Eye Bank from 1996 to 2002.*Ann Transplant.* 2003;8(2):26-31.
26. Hagenah M, Bohnke M (1993) Latent endothelial cell damage after experimental corneal cryopreservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231(9):529–532
Ophthalmol 231(9):529–532
27. Hermel M, Salla S, Fuest M, Walter P. The role of corneal endothelial morphology in graft assessment and prediction of endothelial cell loss during organ culture of human donor corneas. *Acta Ophthalmol.* 2017 Mar;95(2):205-210. doi: 10.1111/aos.13108.
28. Jacobsen U, Michels G, Liedtke G, Muller MC, Reim M (1985) Organ-culture of pig cornea - methods, clinical morphology and histology. *Ophthalmic Res* 17(4):201–201
29. Lindstrom RL, Doughman DJ, Skelnik DL, Mindrup EA.Br J Ophthalmol. Minnesota system corneal preservation. 1986 Jan;70(1):47-54. doi: 10.1136/bjo.70.1.47.
30. Maas-Reijs J, Pels E, Tullo AB. Eye banking in Europe 1991-1995. *Acta Ophthalmol Scand.* 1997 Oct;75(5):541-3. doi: 10.1111/j.1600-0420.1997.tb00146.x.
31. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974;13:165-173.
32. Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P, Schroeter J. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. *Graefe’s Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245: 143-147.
33. Nicolas Builles, Laurent Kodjikian, Carole Burillon, Odile Damour. Major endothelial loss from corneas in organ culture: importance of second endothelial count. *Cornea.* 2006 Aug;25(7):815-20. doi: 10.1097/01.ico.0000230253.62730.85.
34. Oellerich S, Ham L, Frank LE, Gorges S, Bourgonje VJA, Baydoun L, van Dijk K, Melles GRJ. Parameters Associated With Endothelial Cell Density Variability After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2020 Mar;211:22-30. doi: 10.1016/j.ajo.2019.10.017.
35. Paton RT: Corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 1950.33: 3.
36. Pels E, Schuchard Y. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol.* 1983 Dec 15;56(1-2):147-53. doi: 10.1007/BF00154722.
37. Pels L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthalmol.* 1997 Jul;81(7):523-5. doi: 10.1136/bjo.81.7.523.
38. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol.* 2008 Jun;28(3):155-63. doi: 10.1007/s10792-007-9086-1. 10.1007/s10561-013-9411-z.

39. Pels E, Schuchard Y The effects of high molecular weight dextran on the preservation of human corneas. *Cornea*. 1984 3:219–227
40. Pilger D, Torun N, Maier AB, Schroeter J. Pseudophakic corneal donor tissue in Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK): implications for cornea banks and surgeons. *BMJ Open Ophthalmol*. 2020 Aug 23;5(1):e000524. doi: 10.1136/bmjophth-2020-000524.
41. Redbrake C, Salla S, Vonderhecken M, Sieben P, Reim M. Tissue condition of human corneas before and after organ culture. Effect of donor cause of death. *Ophthalmologe*. 1997 Aug;94(8):573-7. doi: 10.1007/s003470050161.
42. Reinhard T, Spelsberg H, Holzwarth D, Dahmen N, Godehardt E, Sundmacher R. Endothelial evaluation of corneal transplants by digital imaging. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1999 Jun;214(6):407-11. doi: 10.1055/s-2008-1034821.
43. Reinshagen H, Böhringer D, Schroeter J, Maier PC. The 2021 Activity Report of the Tissue Transplantation and Biotechnology Section of the German Ophthalmological Society. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2023 May 5. doi: 10.1055/a-2062-3699.
44. Rickmann A, Boden K, Wahl S, Trouvain A, Schulz A, Szurman P. Comparison of clinical outcomes after pre-cut DMEK with or without dextran-containing medium compared to standard DMEK: a prospective pilot study. *Int Ophthalmol*. 2022 Feb;42(2):401-409. doi: 10.1007/s10792-021-02056-w.
45. Ruggeri A, Pajaro S. Automatic recognition of cell layers in corneal confocal microscopy images. *Comput Methods Programs Biomed*. 2002 Apr; 68(1):25-35. doi: 10.1016/s0169-2607(01)00153-5.
46. Ruggeri A, Grisan E, Jaroszewski J. A new system for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. *Br J Ophthalmol* 2005;89:306-11.
47. Ruggeri A, Grisan E, Schroeter J. Evaluation of repeatability for the automatic estimation of endothelial cell density in donor corneas. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1213-1215.
48. Salla S, Kruse FE, Walter P, Menzel-Severing J. Supplementation of organ culture medium with dextran is not required in pre-stripped human donor tissue for DMEK surgery. *Cell Tissue Bank*. 2019 Jun;20(2):193-200. doi: 10.1007/s10561-019-09757-8.
49. Schroeter J, Maier P, Bednarz J, Blüthner K, Quenzel M, Pruß A, Reinhard T. Procedural guidelines, Good tissue practice for cornea banks, *Ophthalmologe*, März/ 2009, 265-276, 106 (3).
50. Schroeter J, Rieck P, Maier P, Reinhard T. Augenhornhaut - Banken und klinische Anwendung, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, November/ 2008, 431-437, 35
51. Schroeter J, Ruggeri A, Thieme H, Meltendorf C. Impact of temporary hyperthermia on corneal endothelial cell survival during organ culture preservation. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 235:753-758.

52. Schroeter J, Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P. Influence of temporary hypothermia on corneal endothelial cell density during organ culture preservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 369-372.
53. Shamsuddin AK, Nirankari VS, Purnell DM, Chang SH. Is the corneal posterior cell layer truly endothelial? *Ophthalmology*. 1986 Oct;93(10):1298-303. doi: 10.1016/s0161-6420(86)33573-5.
54. Singh G, Bohnke M, Draeger J (1984) Endothelial wound healing in organ-cultured pig corneae after mechanical trauma. *Fortschr Ophthalmol* 81(3):293–295
55. Singh G, Bohnke M, von Domarus D, Draeger J, Lindstrom RL, Doughman DJ (1985) Vital staining of corneal endothelium. *Cornea* 4(2):80–91.
56. Spelsberg H, Reinhard T, Sengler U, Daeubener W, Sundmacher R. Organ-cultured corneal grafts from septic donors: a retrospective study. *Eye (Lond)*. 2002 Sep;16(5):622-7. doi: 10.1038/sj.eye.6700145.
57. Sperling S. Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1978 Oct;56(5):785-92. doi: 10.1111/j.1755-3768.1978.tb06643.x.
58. Sperling S. Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979 Apr;57(2):269-76. doi: 10.1111/j.1755-3768.1979.tb00491.x.
59. Sperling S (1980): Endothelial cell density in donor corneas. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 58: 278– 282.
60. Stocker FW. Transplantation of the cornea and its clinical implications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1953; 51:669-786.
61. Storr-Paulsen A, Norregaard JC, Ahmed S, Storr-Paulsen T, Pedersen TH. Endothelial cell damage after cataract surgery: divide-and-conquer versus phaco-chop technique. *J Cataract Refract Surg*. 2008 Jun;34(6):996-1000. doi: 10.1016/j.jcrs.2008.02.013.
62. Summerlin WT, Müller GE, Harris JE, Good RA. The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Invest Ophthalmol* 1973;12:176-180
63. Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos-Guyotat L, Doughty MJ, Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience. *Gain P.Br J Ophthalmol*. 2003 Dec;87(12):1481-6. doi: 10.1136/bjo.87.12.1481.
64. Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Garraud O, Campos-Guyotat L, Maugery J, Gain P. Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in French eye banks. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1299-302. doi: 10.1097/01.tp.0000130970.27013.b9.
65. Taylor MJ, Hunt CJ (1981) Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dyelake reaction. *Br J Ophthalmol* 65(12):815–9

66. Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982 Jun;89(6):531-90.
67. Zirm E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Arch Ophthalmol* 1906;64:580-593.

6. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle aufrichtig, mit Demut und von Herzen bei allen bedanken, die mir meine wissenschaftliche und klinische Ausbildung und Entwicklung ermöglicht haben. Über die nun fünf Jahrzehnte meines Lebens war dies eine große Zahl an unterschiedlichen Menschen. Um niemanden durch die persönliche Benennung einzelner zu vergessen, möchte ich daher an dieser Stelle darauf bewusst verzichten. Ich habe vielen vieles zu verdanken! Danke für alles!

7. Erklärung

Hiermit erkläre ich nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

07.07.2024

.....

Datum

.....

Unterschrift