

# 1 Grundlagen und Problemstellung

Gegenwärtig sind Erkrankungen, die eine Narbenbildung oder Trübung der Hornhaut bedingen, weltweit die häufigste Ursache für eine Erblindung. In Westeuropa, den USA, Japan und Australien, ist der Transparenzverlust der Hornhaut für 20% der Erblindungen verantwortlich.<sup>1</sup>

In der Regel bietet sich als Therapie die Hornhauttransplantation an. Jedoch ist der Bedarf an Hornhäuten seitens der Transplantatempfänger sehr viel größer, als die Zahl gespendeter Hornhäute. Der Mangel an Hornhäuten erklärt den großen personellen und technischen Aufwand, der betrieben wird, um jede zur Verfügung stehende Hornhaut zu transplantieren. Die Auswahl und Einbestellung eines geeigneten Empfängers, die serologischen Untersuchungen zum Ausschluß übertragbarer Erkrankungen durch die Transplantation und die weiteren Vorbereitungen für die Operation, machen eine Lagerung der Hornhäute unumgänglich. Mit den heute zur Verfügung stehenden Konservierungsmöglichkeiten ist eine Lagerung von maximal vier Wochen möglich. Die Gefrierkonservierung stellt von allen Konservierungsverfahren als einzige die Möglichkeit einer unbegrenzten Lagerung von Organen in Aussicht. Trotz zahlreicher Bemühungen sind die bei der Gefrierkonservierung auftretenden Probleme noch nicht soweit gelöst worden, daß ein routinemäßiger Einsatz realisiert werden konnte.

## 1.1 Anatomie und Physiologie der Hornhaut

Die Hornhaut (Cornea) ist das optische Fenster des Auges. Sie ist wie ein Uhrglas in die schwächer gekrümmte Sklera eingefügt. Zusammen bilden sie die fibröse Hülle des Auges.

Der reguläre, durchschnittliche Hornhautdurchmesser des Erwachsenen beträgt 11,5 mm.<sup>2</sup> Im Zentrum ist die Hornhaut 0,50 mm, in der Peripherie 0,65 mm dick. Ihr Krümmungsradius an der Vorderfläche beträgt 7,8 mm.

Mit 43 Dioptrien hat die Hornhaut den stärksten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges. Neben der Wölbung der Hornhaut wird diese hohe Brechkraft durch die

unterschiedlichen Brechungsindizes der Hornhaut gegenüber den angrenzenden Medien Luft (1,0) und Kammerwasser (1,33) hervorgerufen.<sup>3</sup>

Im Horizontalschnitt zeigt die Hornhaut mikroskopisch einen fünfschichtigen Aufbau. Von außen nach innen werden unterschieden:

- vorderes Hornhautepithel (Epithelium anterius)
- Bowman-Membran (Lamina limitans anterior)
- Stroma (Substantia propria)
- Descemet-Membran (Lamina limitans posterior)
- Endothel (Epithelium posterius)

Das Epithel der Hornhaut ist mehrschichtig (5-6 Zellagen), platt und unverhornt. In den basalen Zellschichten kommen zahlreiche Mitosen vor, die auf die Regenerationsfähigkeit des Hornhautepithels hinweisen. Die Zellerneuerung erfolgt in etwa 7 Tagen.<sup>4</sup> Für die Keimabwehr ist die Unversehrtheit des Epithelverbandes notwendig.<sup>2</sup> Unter dem vorderen Epithel verlaufen einige sensible Nervenfasern, die für die ausgeprägte sensible Innervation der Hornhaut sorgen.<sup>4</sup>

An das Epithel der Hornhaut grenzt eine etwa 30 µm dicke homogene Schicht, die Bowman-Membran (Lamina limitans anterior). Sie besteht aus sich kreuzenden Kollagenfasern und feinen Fibrillen sowie einer dichten Interzellularsubstanz und trägt somit wesentlich zur Stabilität und Festigkeit der Hornhaut bei. Zellen kommen in der Bowman-Membran nicht vor.<sup>4</sup> Da sie nicht regenerationsfähig ist, heilt die Membran bei einer Verletzung in der Regel mit einer Hornhautnarbe ab.<sup>2</sup>

Darunter befindet sich das etwa 0,5 mm dicke Stroma der Hornhaut. Es wird von Lamellen paralleler Kollagenfaserbündel, Keratozyten und einer amorphen Grundsubstanz gebildet und besitzt einen hohen Wassergehalt (Tab. 1.1). Daneben sind im Stroma vereinzelt Makrophagen und wandernde lymphatische Zellen nachweisbar.<sup>4</sup> Zwischen den Schichten der kollagenen Fasern, die die ganze Länge der Hornhaut durchziehen, kommen die Keratozyten vor, die nur knapp 10% des Stromavolumens

einnehmen. Die extrazellulären Bestandteile machen hingegen einen Volumenanteil von 90% aus.<sup>5</sup>

**Tabelle 1.1** Zusammensetzung des Hornhautstromas (nach Reim, 1971<sup>5</sup>)

Strukturproteine: Kollagen (unlöslich)	15%
Andere Proteine (meist löslich)	5%
Glykosaminoglykane	1%
Mineralsalze und extrazelluläre Metabolite	1%
Wasser	78%

Zellen und Fasern des Stromas sind in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet, die sich vornehmlich aus sauren Keratoglykosaminoglykanen (Tab. 1.2) zusammensetzt.<sup>4</sup> Die Glykosaminoglykane der Hornhaut sind in vivo fest mit einem spezifischen Protein, dem Core-Protein verbunden. Sie bilden mit diesem zusammen die Proteoglykane, die gewebespezifisch sind. Die Proteoglykane haben die Aufgabe, die kollagenen Fasern in einem regelmäßigen Abstand zueinander zu halten. Diesen außerordentlich regelmäßigen Aufbau können die Proteoglykane nur aufgrund ihrer langen Seitenketten und ihrer hohen Wasserbindungsfähigkeit gewährleisten.<sup>5</sup>

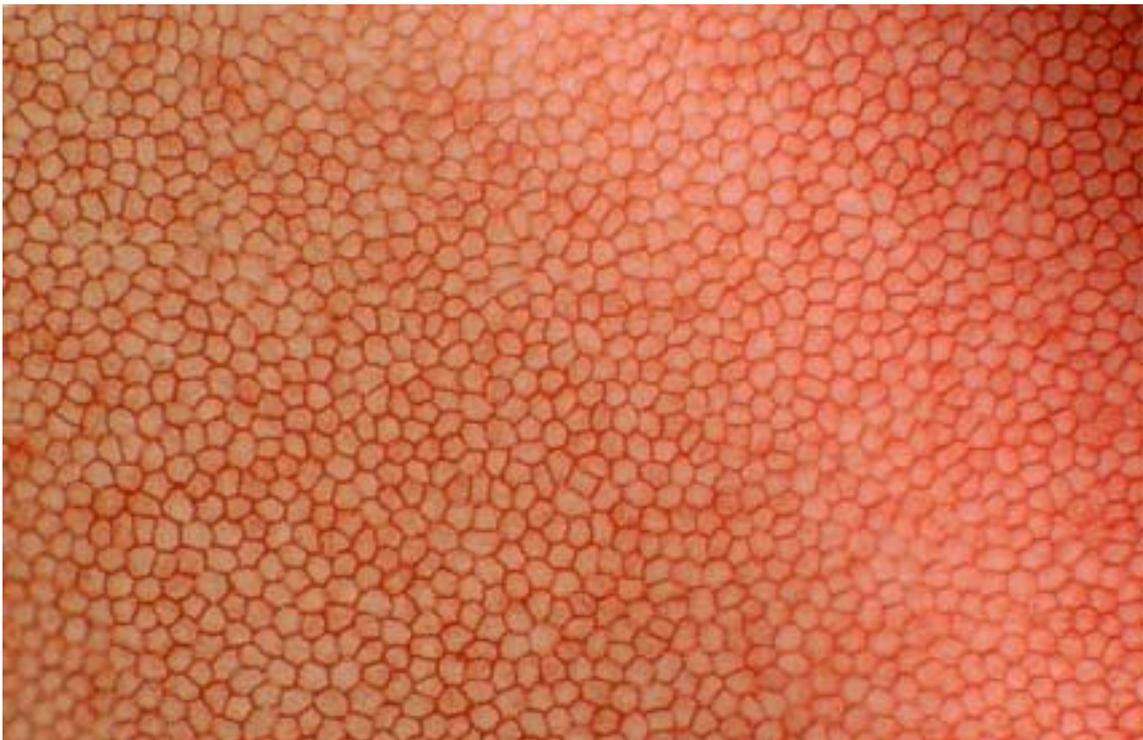
**Tabelle 1.2** Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane in der Hornhaut (nach Rauen, 1964<sup>5</sup>)

Keratansulfat	59%
Chondroitin	2%
Chondroitin-4-Sulfat (Chondroitinsulfat A)	38%
Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B)	1%
Gehalt in % des Trockengewichtes der Hornhaut	2-4

Die Descemet-Membran befindet sich zwischen dem Stroma der Hornhaut und dem Endothel und bildet die Basalmembran der Endothelzellen. Ultrastrukturell besteht sie aus der embryonalen und der im Laufe des Lebens von den Endothelzellen sezernierten

Schicht.<sup>6</sup> Ihre Dicke, die daher mit dem Alter zunimmt, beträgt beim Erwachsenen durchschnittlich 10  $\mu\text{m}$ . Die Membran besteht aus einer homogenen Grundsubstanz, die ein dreidimensionales Netz zarter Kollagenfibrillen enthält.<sup>4</sup>

Das Endothel (hinteres Korneaepithel) ist ein typisches einschichtiges Plattenepithel, dessen Zellen eine hexagonale Form besitzen<sup>4</sup>(Abb. 1).



**Abbildung 1** Das Hornhautendothel besteht aus einer einschichtigen Lage hexagonaler Zellen (Abbildung des Endothels vom Schwein nach Anfärbung mit Alizarinrot S und Trypanblau; 200fache Vergrößerung)

In den ersten Lebensjahren beträgt die durchschnittliche Zelldichte etwa 4000 Zellen/ $\text{mm}^2$  und sinkt dann im Erwachsenenalter auf Werte zwischen 2000-3000 Zellen/ $\text{mm}^2$ . Im Vergleich zum Epithel besitzt das Endothel kaum Fähigkeiten zur Regeneration. Laing konnte zwar auch beim Endothel des Menschen Mitosen nachweisen,<sup>7</sup> jedoch reagiert das Endothel auf Schädigungen vornehmlich durch Abflachung der Zellen, sowie durch Bildung von Riesenzellen.<sup>5</sup> Untereinander sind die Endothelzellen durch Nexus verbunden.<sup>8</sup> Diese plaqueartigen Bereiche der Zellkom-

munikation dienen der metabolischen und der ionalen Koppelung benachbarter Zellen.<sup>4</sup> An seiner Rückfläche wird das Endothel vom Kammerwasser der vorderen Augenkammer umspült.

Die Ausbildung eines scharfen Abbilds auf der Netzhaut (Retina) setzt voraus, daß Brechkraft und Transparenz der Hornhaut konstant gehalten werden. Die Transparenz hängt von der Hydratation der Hornhaut ab.<sup>9</sup> Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß sich der Durchmesser der Kollagenfibrillen in geschwollenen Hornhäuten nicht wesentlich von dem bei normalen Fibrillen unterscheidet. Dies legt nahe, daß die Schwellung der Hornhaut eher auf eine Volumenzunahme der Glykosaminoglykane zurückzuführen ist.<sup>10</sup> Die Hydratation, bei der die Transparenz der Hornhaut maximal ist, ist bei einem hydrostatischen Druck von  $-40$  mmHg, also einer leichten Dehydrierung gegeben. Diese wird durch den aktiven Transport von Ionen und nachfolgendem Wasser aus dem Stroma in das Kammerwasser aufrechterhalten.<sup>9</sup> Von besonderer Bedeutung für diese Transportvorgänge ist die im Hornhautendothel lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase.<sup>4</sup> Zugleich strömen jedoch auch Wasser und Ionen durch die Schlußleisten des Endothels wieder zurück in das Stroma und verringern den negativen Druck, so daß sich ein Fließgleichgewicht einstellt. Erst die Balance zwischen aktivem Transport und Leckfluß gewährleistet die normale leichte Dehydratation und damit die Transparenz der Hornhaut. Im Hornhautendothel sind sowohl der Leckfluß, als auch der dem aktiven Ionentransport folgende Wassertransport um etwa eine Dekade größer als im Hornhautepithel. Schädigungen des Hornhautendothels verursachen daher stärkere Veränderungen der Hornhauttransparenz als vergleichbare Schädigungen des Hornhautepithels.<sup>9</sup>

Eine anatomische Besonderheit stellt die Gefäßfreiheit der Hornhaut dar. Ernährt wird die Kornea aus den Gefäßen der Umgebung, dem Kammerwasser und durch den Tränenfilm.<sup>4</sup> Im Falle einer Schädigung bedingt die Gefäßfreiheit zwar eine langsame Regeneration der Hornhaut, andererseits ist mit der Gefäßfreiheit aber auch ein immunologisches Privileg verbunden, das sich bei der Hornhauttransplantation positiv auswirkt. (siehe Kap. 1.2.1)

## 1.2 Hornhauttransplantation

Unter einer Hornhauttransplantation, auch Keratoplastik genannt, versteht man den Ersatz einer erkrankten Hornhaut durch eine gesunde Spenderhornhaut. Als Transplantat dienen in der Regel homologe frische bzw. konservierte Leichenhornhäute.<sup>11</sup> Die ersten Erfolge bei Versuchen zur Hornhauttransplantation erzielte v. Hippel 1888 bei der Übertragung von vorderen Hornhautlamellen.<sup>12 13</sup> Die von v. Hippel entwickelten Instrumente, das Konzept der Antisepsis von Lister und die Entdeckung von Anästhetika führten schließlich zur ersten erfolgreichen perforierenden Keratoplastik durch Zirm im Jahre 1906.<sup>14</sup> Gegenwärtig stellt die Keratoplastik die häufigste Transplantation am Menschen dar und wird in der Regel als perforierende Keratoplastik ausgeführt.

### 1.2.1 Perforierende Keratoplastik

Bei der perforierenden Keratoplastik (PKP) wird eine alle Hornhautschichten umfassende Spenderhornhaut mit einem Durchmesser von etwa 6,5 bis 7,5 mm in ein Empfängerbett entsprechender Größe transplantiert. In eine trübe oder irregulär brechende Hornhaut wird eine klare, regulär brechende Hornhaut eingesetzt.<sup>2</sup> Das Transplantat wird mit einer Naht, am besten mit einer Kreuzstichnaht, fixiert.<sup>15</sup> Die perforierende Keratoplastik kann zur Visusverbesserung oder als Notfalleingriff durchgeführt werden. Als Notfalleingriff ist sie bei einem perforierten Auge zum Erhalt des Auges notwendig. Indikationen für die perforierende Keratoplastik sind Erkrankungen, die die Hornhaut in voller Dicke erfassen (Narben, Dystrophien, Degenerationen) oder Wölbungsanomalien der Hornhaut wie Keratokonus und Keratoglobus.<sup>2</sup> Ein Grund für die deutliche Zunahme perforierender Keratoplastiken liegt neben den erheblich verbesserten chirurgischen Techniken in der Ausweitung der Indikationsstellung. So wird zusätzlich zu den oben genannten Erkrankungen auch das Hornhautödem durch eine Keratoplastik therapiert. Das Hornhautödem kommt u.a. als mögliche Komplikation bei den immer häufiger durchgeführten Operationen des vorderen Augenabschnittes vor (z.B. Katarakt-Operation).<sup>13</sup>

Es werden zwei Formen des Transplantatversagens unterschieden. Bei der frühen Form kommt es ab dem ersten Tag zur Eintrübung der Hornhaut. Ursachen dafür liegen in einer endothelialen Dysfunktion aufgrund einer defekten Spenderhornhaut oder dem Operationstrauma. Die späte Form ist hingegen meist das Ergebnis einer immunologischen Abstoßungsreaktion. Bei 50% der Fälle einer immunologischen Abstoßungsreaktion tritt diese in den ersten 6 Monaten auf.<sup>16</sup> Jedoch sind aufgrund der immunologischen Sondersituation der Hornhaut, bedingt durch das Fehlen von Gefäßen, Transplantatreaktionen vergleichsweise selten und die Prognose ist insgesamt gut. So können Spenderhornhäute ohne vorherigen Vergleich der Transplantationsantigene des Spenders und des Empfängers transplantiert werden, wobei bei guter Prognose das Risiko einer Immunreaktion etwa bei 11% liegt.<sup>17</sup> Dennoch kann das Abstoßungsrisiko durch eine Gewebetypisierung weiter gesenkt werden, weshalb deren Durchführung zu empfehlen ist.<sup>18 19</sup> Bei stark vaskularisierter Empfängerhornhaut (z.B. infolge einer Verätzung oder Entzündung) ist mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko zu rechnen.<sup>2</sup>

Neben der Immunreaktion bleibt der postoperative Astigmatismus eine der Herausforderungen bei der Wiederherstellung eines guten Sehvermögens nach einer Keratoplastik.<sup>13</sup>

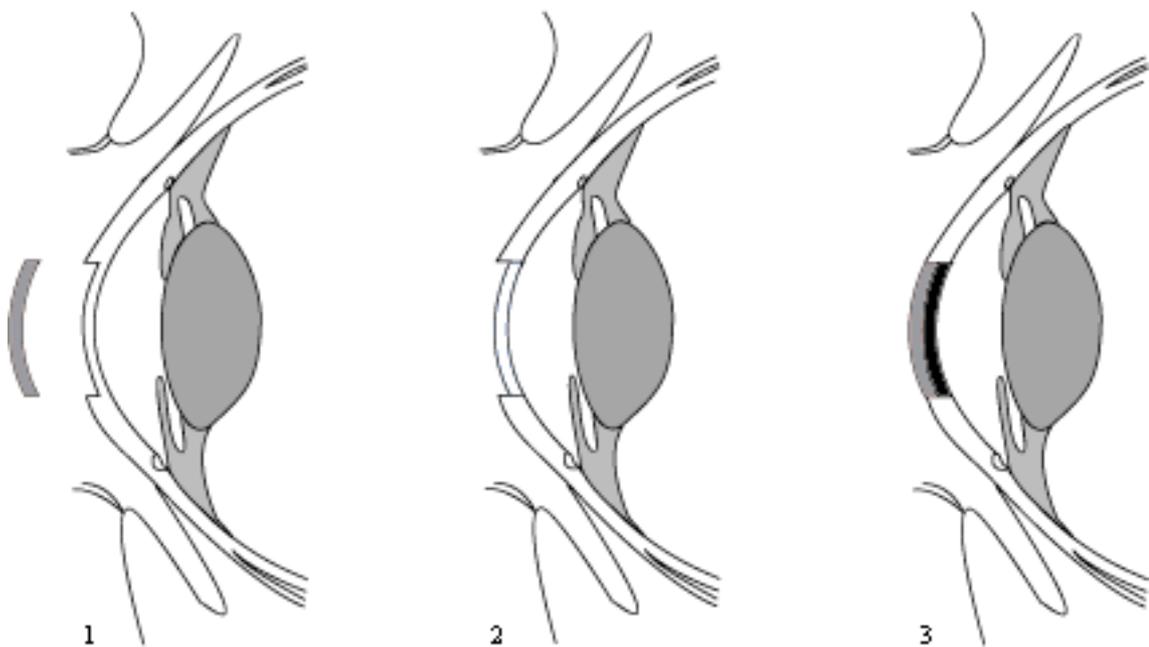
### 1.2.2 Lamelläre Keratoplastik

Bei der lamellären Keratoplastik (LKP) wird eine oberflächliche Hornhautlamelle transplantiert. Bei dieser Operation ist es notwendig, daß das Hornhautendothel, die Descemet-Membran und die unteren Schichten des Stromas beim Empfänger intakt sind. Die Durchführung einer lamellären Keratoplastik ist bei oberflächlichen Hornhauttrübungen indiziert. Die immunologische Abstoßung ist seltener und die Infektionsgefahr ist geringer als bei der perforierenden Keratoplastik.<sup>2</sup> Die lamelläre Keratoplastik wird heute kaum noch durchgeführt, wobei sie jedoch durch die Zunahme refraktiver hornhautchirurgischer Eingriffe wieder an Bedeutung gewinnt.<sup>13</sup>

### 1.2.3 Hintere lamelläre Keratoplastik

Die Hornhauttransplantation wird heute in der Regel als perforierende Keratoplastik ausgeführt. Bei vielen Empfängern von Spenderhornhäuten ist aber nur das Endothel erkrankt und das Hornhautstroma wie auch das Epithel zeigen eine regelrechte Funktion (z.B. Fuchs-Endotheldystrophie, Pseudophakische bullöse Keratopathie). Bei diesen Krankheitsbildern wäre folglich eine Transplantation ausschließlich des Endothels ausreichend.

Diese Überlegungen haben zur Entwicklung der hinteren lamellären Keratoplastik geführt, bei der nur das Endothel mit der Descemet-Membran und ein Teil des Hornhautstromas transplantiert werden. Epithel, Bowman-Membran und der überwiegende Teil des Hornhautstromas verbleiben in situ (Abb. 2).



**Abbildung 2** Hintere lamelläre Keratoplastik; 1. Zunächst wird eine vordere Hornhautlamelle (grau) abgetragen und aufbewahrt; 2. Anschließend wird der hintere Anteil der Empfängerhornhaut (weiß) durch Trepanation entfernt; 3. An deren Stelle wird die hintere Spenderlamelle (schwarz) eingesetzt und zusammen mit der aufbewahrten Decklamelle des Empfängers vernäht

Die Technik der hinteren lamellären Keratoplastik wurde 1997 von Melles beschrieben. Ausgehend vom Boden eines 8 mm breiten Schnittes am Limbus, der bis zu einer Tiefe

von 50% der Hornstärke angelegt wird, wird eine Tasche im Hornhautstroma geschaffen. In diese wird ein speziell angefertigtes Instrument eingebracht, mit dessen Hilfe eine hintere, im Durchmesser 6 mm große Hornhautlamelle herausgeschnitten wird. Der auf diese Weise entstandene Gewebedefekt wird mit einer am Spenderauge gewonnenen hinteren Lamelle gedeckt. Der limbale Schnitt wird mit einer fortlaufenden 10-0 Naht verschlossen.<sup>20</sup> Diese Technik wurde bereits klinisch bei drei Patienten eingesetzt.<sup>21</sup> Es ist vorstellbar, daß mit der hinteren lamellären Keratoplastik bessere refraktive Ergebnisse erzielt werden können als mit der durchgreifenden Keratoplastik.

### 1.3 Hornhautbanken

Eine Hornhautbank besorgt, untersucht und verteilt Hornhäute von verstorbenen Menschen, für die eine Einverständniserklärung zur Organspende vorliegt. Die gespendeten Hornhäute werden in erster Linie für Hornhauttransplantationen verwendet. Um den Transplantatempfängern den einwandfreien Zustand der Spenderhornhäute garantieren zu können, werden die Hornhäute und die Krankengeschichten der Spender nach standardisierten Richtlinien untersucht. Dazu gehören auch Blutuntersuchungen zum Ausschluß einer Infektion mit HIV oder Hepatitisviren. Hornhäute, die nicht für Transplantationen geeignet sind, werden für Forschungs- oder Lehrzwecke zur Verfügung gestellt.

Die erste Hornhautbank wurde in den frühen 30er Jahren durch Filatov in Odessa (Ukraine) eingerichtet. In den Vereinigten Staaten wurde die erste Hornhautbank 1945 durch Paton gegründet.<sup>22</sup>

Allein in den USA wurden 1997 45493 Keratoplastiken durchgeführt.<sup>23</sup> Diese hohe Zahl an Transplantationen wird durch ein in den Vereinigten Staaten aufgebautes System national und international arbeitender Hornhautbanken ermöglicht. In Europa sind Hornhautbanken meist an Augenkliniken angeschlossen. Sie versorgen nur die Bevölkerung im Einzugsbereich der Augenklinik. International arbeitende Organisationen in Europa sind BIS in Leiden, Scanditransplant in Dänemark und der United Kingdom Transplantation Service in Bristol.<sup>24</sup>

## 1.4 Routineverfahren der Hornhautkonservierung

Der Einsatz von Konservierungsverfahren zur Lagerung von Hornhäuten durch Hornhautbanken ist unumgänglich, da die Unterbrechung der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr nach dem Tod des Spenders bei Raumtemperatur zu einer Zerstörung der Zellen durch Autolyse führt.<sup>25</sup>

Das Konservierungsverfahren sollte zum einen die Vitalität und Integrität der Endothelzellen erhalten. Dazu gehören neben einer großen Zahl lebender Endothelzellen ( $>2000$  Zellen/mm<sup>2</sup>, weniger als 10% tote Zellen<sup>26</sup>) auch die Intaktheit der endothelialen Pumpfunktion.

Zum anderen sollte die Dauer der Lagerung soweit verlängert werden, daß eine effiziente Nutzung der Spenderhornhäute möglich wird.<sup>25</sup> Eine Verlängerung der Lagerungszeiten würde die Operationsplanung vereinfachen, auch könnten die bestehenden Wartezeiten für eine Transplantation deutlich verkürzt werden. Eine Vorratshaltung an Hornhäuten würde zudem die ausschließliche Verwendung von gewebetypisierten und gewebeübereinstimmenden Transplantaten ermöglichen.

Außerdem sollte die Methode möglichst einfach durchzuführen sein, das Transplantat nicht kontaminiert werden, und ein Transport der Hornhäute möglich sein.<sup>27</sup>

Die Klassifikation der verschiedenen Konservierungsverfahren richtet sich nach der Dauer, für die sie die Hornhäute vor einer Schädigung bewahren.

### 1.4.1 Kurzzeit-Konservierung

Das erste Verfahren, das eingesetzt wurde um Hornhäute für wenige Tage zu konservieren, war die Aufbewahrung in der feuchten Kammer. Hierbei werden ganze Augäpfel in sterilen, fest zu verschließenden Gefäßen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lagerung bei 4°C verlangsamt den Stoffwechsel des Gewebes, verzögert den Verbrauch an Nährstoffen und damit den Funktionsverlust des Gewebes. Durch Auskleidung des Gefäßbodens mit feuchtem Zellstoff erreicht man eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit im Gefäß, wodurch eine Austrocknung des Gewebes verhindert werden kann. Wenn die Zeit zwischen dem Tod des Spenders und der Enukleation 4 bis 6 Stunden beträgt, kann die Hornhaut auf diese Weise für 48 Stunden

gelagert werden.<sup>25</sup> Canals-Imohr ermittelte hingegen als maximal zu tolerierende Lagerungszeit 24 Stunden, wenn eine post-mortem-Zeit von unter 12 Stunden eingehalten wurde.<sup>28</sup> Ein wichtiger Kritikpunkt an dieser Methode ist, daß das Endothel gegenüber dem Kammerwasser exponiert bleibt.<sup>25</sup> Denn im Kammerwasser wurden bereits kurze Zeit nach dem Tod des Spenders autolytische Veränderungen nachgewiesen.<sup>29</sup> Die Konservierung in der feuchten Kammer ist die einfachste und preiswerteste aller Konservierungsmethoden für Hornhäute. Auch wenn diese Methode in den Industrieländern nur noch in Ausnahmefällen angewandt wird, ist sie insbesondere für die Länder der dritten Welt von großem Nutzen. In diesen ist der Bedarf an Spenderhornhäuten am größten und die Techniken der Zellkultur und der bakteriologischen Kontrolle sind nicht immer verfügbar.

Man gewann schnell die Erkenntnis, daß längere Lagerungszeiten nur durch Präparation der Hornhaut und deren Lagerung in Nährmedien erreicht werden konnten. Obwohl diese Methode bereits 1911 veröffentlicht wurde, erlangte die Lagerung von Korneoskleralscheiben keine weite Akzeptanz bis es 1974 zur Einführung des McCarey-Kaufman (M-K) Mediums kam. Inzwischen hat die Aufbewahrung in M-K-Medium bei 4°C starke Verbreitung gefunden.<sup>22</sup>

Das McCarey-Kaufman Medium ist eine Mischung aus Gewebekulturmedium (TC 199) und 5% Dextran (40000 D). Als eine osmotisch wirksame Substanz verhindert Dextran die Schwellung des Stromas der ausgeschnittenen Hornhaut in dem flüssigen Medium. Neben Dextran enthält das Medium auch Zusätze an Puffersubstanzen (HEPES) und eine Kombination aus Penicillin, Gentamicin und Polymyxin als Antibiotika.<sup>25</sup> Die Akzeptanz dieser Methode ist darauf zurückzuführen, daß sie (wie auch die Konservierung in der feuchten Kammer) wenig kostenintensiv ist und technisch geringen Aufwand erfordert. Heutzutage wird die Lagerung in McCarey-Kaufman Medium für eine Dauer von maximal 72 Stunden als vertretbar angesehen.<sup>22</sup>

#### 1.4.2 Intermediäre Konservierungsverfahren

Wie bei der Konservierung in M-K-Medium wird auch bei der intermediären Konservierung eine Korneoskleralscheibe in einem definierten Kulturmedium bei 4°C

inkubiert. Die Zugabe von Chondroitinsulfat war eine Schlüsselentwicklung in der Entstehung der intermediären Konservierungsmedien und ermöglichte die Verlängerung der Lagerungszeiten. Verschiedene Medien für Hornhäute wurden in den USA und Europa für den klinischen Einsatz entwickelt. Davon sind vor allem Dexsol, Optisol (Chiron Ophthalmics Inc. Irvine, California) und Likorol (Opsia Pharma, France) von klinischer Bedeutung.<sup>25</sup> Die maximale Lagerungszeit in Dexsol beträgt 10 Tage, in Optisol und Likorol 14 Tage.<sup>28</sup>

### 1.4.3 Organkultur

Die Organkultur von Hornhäuten hat im Gegensatz zu den bislang vorgestellten Konservierungsverfahren das Ziel, die physiologischen Verhältnisse *in vivo* zu simulieren und die Zellfunktionen auf diese Weise zu erhalten. Zu diesem Zweck werden die Korneoskleralscheiben in Gewebekulturmedien bei etwa 37°C und physiologischem pH-Wert im Brutschrank aufbewahrt. Um eine Kontamination der Hornhaut zu verhindern, werden dem Kulturmedium Antibiotika und Antimykotika zugesetzt.

1972 begannen Doughman und seine Mitarbeiter mit Untersuchungen zur Organkultur von Spenderhornhäuten zum Zwecke einer Langzeitkultivierung. Beim klinischen Einsatz blieben 80% der transplantierten Hornhäute bei einer Aufbewahrungszeit von durchschnittlich 25 Tagen klar.<sup>25</sup>

Ein Problem der Organkultivierung ist die auf Dauer schädliche Wirkung von Dextran, das als Entquellungs-substanz dem Organkulturmedium zugesetzt werden muß. Derzeit wird von den meisten Hornhautbanken eine von Sperling<sup>30</sup> entwickelte und von Pels<sup>31</sup> modifizierte Methode verwendet. Dabei werden die bei 31°C ohne Dextran-Zusatz inkubierten Hornhäute 24 Stunden vor der Operation in einer dextranhaltigen Lösung entquollen.<sup>24</sup> Die Hornhäute sollten bis zur Transplantation maximal vier Wochen organkultiviert werden.<sup>32</sup>

## 1.5 Die Gefrierkonservierung der Hornhaut

### 1.5.1 Eigenschaften und Grundlagen der Gefrierkonservierung

Eine ideale Möglichkeit den unvermeidbaren Gewebeverfall zu unterbrechen, stellt die Gefrierkonservierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff als Lagerungsmedium dar. Die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  sorgt für einen effektiven Stillstand aller Aspekte von Wachstum und Entwicklung, wie auch für ein Maximum an genetischer Stabilität. Bei solchen Temperaturen laufen die normalen zellulären chemischen Reaktionen nicht ab, da das Energieniveau zu niedrig ist, um die für einen Ablauf der Reaktion ausreichende molekulare Bewegung zuzulassen.<sup>33</sup> Der hierfür notwendige Kühlvorgang kann mit unterschiedlichen Kühlraten durchgeführt werden.

Wenn Zellen unter Verwendung relativ langsamer Kühlraten in einer wässrigen Lösung eingefroren werden, bildet sich das Eis zunächst im extrazellulären Medium. Die Bildung von Eis hinterläßt notwendigerweise einen Rest einer extrazellulären Lösung, deren Volumen sich zunehmend verringert und deren Konzentration an gelösten Stoffen kontinuierlich ansteigt. Die Zellen, die zunächst mit der umgebenden Lösung im osmotischen Gleichgewicht standen, verlieren nun über ihre semipermeable Zellmembran Wasser und beginnen zu schrumpfen (Kryodehydratation). Da auch Wasser die Zellmembranen nicht ungehindert passieren kann, hängt das Ausmaß der Zellschrumpfung vom zeitlichen Verlauf der Abkühlung ab. Bei sehr langsamer Abkühlung kann viel Wasser die Zelle verlassen, wodurch es zu einer starken Zellschrumpfung, und damit verbunden zu hohen zellschädigenden Salzkonzentrationen im Zellinnern kommt. Bei zu schneller Abkühlung verbleibt wenig Zeit für eine osmotische Wasserabgabe. Durch den dann hohen intrazellulären Wassergehalt wird die Bildung von intrazellulärem Eis während des weiteren Abkühlens sehr wahrscheinlich. Die Eisbildung bei zu schneller Abkühlung ist ebenso wie die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen bei zu langsamer Abkühlung für die Zelle letal. Diese beiden Schädigungsmechanismen wurden von Mazur als Zwei-Faktor-Hypothese beschrieben.<sup>34</sup>

Es gibt folglich eine optimale Kühlrate, bei der die Zellen zwar maximal dehydratisiert sind, die intrazellulären Salzkonzentrationen jedoch noch zu keiner Schädigung führen.

Während des Einfrierens entstehen jedoch noch weitere zahlreiche Streßfaktoren, von denen jeder die Zelle potentiell schädigen kann. Diese umfassen:

- Rückgang der Temperatur
- Mechanische Effekte extrazellulärer Eiskristalle
- Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Restlösung (pH-Wert, Viskosität)
- Entstehung von Gasblasen und elektrischen Feldern an der Eis-Medium-Grenzfläche, die mit dem Plasmalemm interagieren können

Trotz der potentiell schädigenden Effekte beim Einfrieren, konnten mit dieser Methode einige Zelltypen und Gewebe erfolgreich konserviert werden. Konservierbar sind vornehmlich einzelne Zellen wie Spermatozyten, rote Blutkörperchen, Oozyten, sowie Embryonen. Bereits bei etwas umfassenderen Zellverbänden wie den Langerhans-Inseln, sind erheblich mehr Schwierigkeiten zu überwinden. Bei der Tiefkühlkonservierung von größeren Organen und Organismen treten Probleme auf, die bislang, trotz gelegentlich anderslautender Meldungen, als weitgehend ungelöst angesehen werden müssen. Die mit wachsender Größe des Gefriergutes einhergehende Abnahme der Erfolgsaussichten hat vielfältige Gründe. Die Erzeugung von beliebigen überall im Gefriergut gleichen Kühl- und Heizraten wird aus physikalischen Gründen mit zunehmender Größe immer schwieriger. Organe setzen sich in der Regel aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Bei Vorliegen nur einer Zellspezies können hingegen alle Randbedingungen des Verfahrens speziell auf den vorliegenden Zelltyp abgestimmt werden. Zum Beispiel gibt es für jede Zellart einen anderen optimalen Wert der Kühlrate.

Anders als bei Zellverbänden besteht bei einzelnen Zellen, z.B. bei Erythrozyten, die Möglichkeit den geschädigten Anteil nach dem Auftauen durch einen Waschvorgang zu entfernen, so daß eine hundertprozentig vitale Konserve hergestellt werden kann, auch wenn nur 10 % der Zellen den Gefrier- und Auftauprozess überstanden haben.<sup>35</sup>

Die Hornhaut gehört zu den Organen für die, trotz zahlreicher Untersuchungen, bisher keine geeignete Methode zur Gefrierkonservierung entwickelt wurde. Dabei bietet die Hornhaut den großen Vorteil, daß die Einfrierbedingungen ganz auf die Bedürfnisse des Hornhautendothels abgestimmt werden können, da die anderen Bestandteile der Horn-

haut entweder gegenüber dem Einfrierprozeß unempfindlich sind (Kollagen) oder durch einwandernde Zellen des Empfängers nach der Transplantation ersetzt werden (Epithel). Es gibt Hinweise, daß die Gefrierkonservierung der Hornhaut zu einer Abnahme der Immunogenität des Gewebes führt.<sup>36</sup> Dies wäre neben der zeitlich unbegrenzten Lagerung ein weiterer Anreiz zur Etablierung eines Verfahrens zur Kryokonservierung.

### 1.5.2 Gefrierschutzmittel/Kryoprotektoren

Voraussetzung für eine erfolgreiche Gefrierkonservierung ist die Verwendung von geeigneten Kryoprotektoren. Unter Kryoprotektoren (cryoprotective agents; CPA's) versteht man Chemikalien, die das Überleben von Zellen während des Einfrier- und Auftauprozesses fördern. Die zufällige Entdeckung Polges von Glycerol als effektivem Gefrierschutzmittel war der Beginn der modernen Kryobiologie; seine Entdeckung erlaubte schnelle Fortschritte beim Einfrieren von Säugetier-Spermatazoen.<sup>37</sup> 1959 entdeckten dann noch Lovelock und Bishop die Schutzwirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO), dem heutzutage am weitesten verbreiteten Gefrierschutzmittel.<sup>38</sup>

Alle Kryoprotektoren sind gut wasserlöslich. Viele von ihnen sind Alkohol- oder Zuckerderivate. Es werden zwei große Gruppen an Kryoprotektoren unterschieden. Die Stoffe der einen Gruppe können Zellmembranen passieren und können daher auch intrazellulär wirken. Substanzen der anderen Gruppe durchdringen die Zellmembranen nicht und werden daher als extrazelluläre Kryoprotektoren bezeichnet. Der Unterschied beruht auf dem unterschiedlichen Molekulargewicht der Kryoprotektoren. Intrazelluläre Kryoprotektoren haben meist ein Molekulargewicht von unter 100 Dalton. In Tabelle 1.3 werden einige Gefrierschutzmittel beider Gruppen und die jeweils zugehörigen Schutzmechanismen aufgeführt.

**Tabelle 1.3** Beispiele einiger nieder- und makromolekularer Kryoprotektoren und ihrer Wirkmechanismen

	<b>Niedermolekulare/ Intrazelluläre Kryoprotektoren</b>	<b>Makromolekulare/ Extrazelluläre Kryoprotektoren</b>
<b>Substanzen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimethylsulfoxid</li> <li>• Glycerol</li> <li>• Ethylenglycol</li> <li>• Methanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydroxyethylstärke</li> <li>• Dextran</li> <li>• PVP</li> <li>• Albumin</li> <li>• Chondroitinsulfat</li> </ul>
<b>Allgemeiner Wirkmechanismus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdrängung intrazellulären Wassers</li> <li>• Erniedrigung des Gefrierpunkts</li> <li>• Verringerung der intrazellulären Eisbildung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduktion des Anstiegs der Salzkonzentration im Extrazellularraum</li> <li>• Verringerung der Zellschrumpfung</li> <li>• Behinderung der Kristallisation des extrazellulären Wassers</li> </ul>

Der kryoprotektive Effekt der Kryoprotektoren ist dosisabhängig. Dosisabhängig sind aber auch deren unerwünschte toxischen und osmotischen Wirkungen.

Das Ausmaß der Schädigung, die durch die Toxizität der Gefrierschutzmittel hervorgerufen wird, nimmt mit steigender Konzentration des Kryoprotektors zu. Auch eine Erhöhung der Temperatur und der Expositionsdauer der Zellen gegenüber dem Kryoprotektor führt zu einer stärkeren Schädigung. Die Ergebnisse einiger Versuche, in denen die Toxizität von Kryoprotektoren gegenüber dem Hornhautendothel getestet wurde, sind in der Tabelle 1.4 zusammengefaßt.

**Tabelle 1.4** Ergebnisse einiger Versuche über die toxische Wirkung von Gefrierschutzmitteln auf das Hornhautendothel

Autor/Jahr	Gefrierschutzmittel	Konzentration (mol/l)	Dauer der Exposition (min.)	Temperatur während der Exposition (°Celsius)	Spezies	Ergebnis/Zellverlust
Taylor 1985 <sup>39</sup>	DMSO	1	30 oder 60	0	Kaninchen	Endothel behält seine Funktion und normale Morphologie; besseres Ergebnis bei schrittweiser Ausschleusung
Taylor 1989 <sup>40</sup>	DMSO	3	30	0	Kaninchen	bei schrittweiser Konzentrationserhöhung und -erniedrigung kam es zu keiner signifikant stärkeren Schwellung als im Kontrollmedium
Madden 1989 <sup>41</sup>	DMSO	3	5	0	Kaninchen	-5,89%
		4	5	0		-4,28%
		3	5	0		-0,92%
		4	5	0		-9,29%
		3	10	0		-9,12%
		4	10	0		-4,93%
	Glycerol	2	5	37		-0,09%
		3	5	37		-21,38%
	1,2-Propandiol	2	5	20		-7,55%
	PVP	400g/l	60	0		-0,31%
Armitage 1989 <sup>42</sup>	•DMSO	2,62	5	-5	Kaninchen	toleriert; Dehydratation erhalten
	•Acetamid	2,62	5	0		Endothel stark zerstört
	•1,2-Propandiol	1,32	5	-5		bei 2 von 4 Hornhäuten Endothel stark geschädigt
	•Polyethylen-glycol	6%w/v	5	-10		3 von 4 Hornhäuten zeigten normale Dehydratation; gute Morphologie
Armitage 1989 <sup>42</sup>	•DMSO	2,36	5	0	Kaninchen	toleriert; Dehydratation erhalten; Morphologie unauffällig
	•Acetamid	2,36	15	0		2 von 4 Hornhäuten beschädigt
	•1,2-Propandiol	1,18				
	•Polyethylen-glycol	5,4%w/v	15	-5	toleriert; Dehydratation erhalten; Morphologie unauffällig	

Autor/Jahr	Gefrier- schutzmittel	Konzentration (mol/l)	Dauer der Exposition (min.)	Temperatur während der Exposition (°Celsius)	Spezies	Ergebnis/Zellverlust
Brunnette 1989 <sup>43</sup>	Glycerol	30	15	4	Mensch	toleriert
		40	15	4		Anstieg der mittleren Zellgröße um 20%
		4,1	10	-10		toleriert
		4,8	10	-10		beschädigt
		5,4	10	-10		beschädigt
Bourne 1994 <sup>45</sup>	Glycerol	4,3	15	4	Mensch	-1,8%
	+2,5% ChS (w/v)	5,4	15	4		-47,7%
		2,0	10	0		-4,5%
		3,5	10	0		-26,8%
		3,5	10	0		-29,7%
	DMSO	2,0	15	4		-5,8%
	+2,5% ChS (w/v)	3,0	15	4		-15,3%
		3,0 <sup>1)</sup>	15	4		-23,4%
		3,0 <sup>2)</sup>	15	4		-38,3%
		3,5	10	0		-1,4%
		4,3	10	0		-22,0%
		4,3	10	0		-6,6%
		4,3	10	0		-21,4%
	1,2- Propandiol	3,0	15	4		-21,2%
		3,5	10	0		-24,2%
	+2,5% ChS (w/v)	3,5	10	0		-15,6%
	2,3- Butandiol	2,0	15	4		-1,6%
		3,0	15	4		-55,6%
	+2,5% ChS (w/v)	2,5	10	0		-5,5%
		3,0	10	0		-18,0%
Bourne 1994 <sup>46</sup>	•DMSO •Formamid •1,2- Propandiol •ChS	3,1 3,1 2,2 2,5% <sub>w/v</sub>	10	0	Mensch	-4,3%
Wusteman 1997 <sup>47</sup>	DMSO	2,6	30	2	Kaninchen	wenige anfärbbare Zellkerne; Zellgrenzen unverändert; um 18% verdickte Hornhaut nach 3h Perfusion

Die toxische Wirkung von Kryoprotektoren auf Zellen beruht auf Interaktionen zwischen den Kryoprotektoren und den Proteinen der Zellen. Das Paradoxon, daß Komponenten wie z.B. Dimethylsulfoxid auf der einen Seite als Kryoprotektoren fungieren können, andererseits bei höheren Temperaturen eine Proteindenaturierung induzieren, kann in Anbetracht der Temperaturabhängigkeit von hydrophobischen Interaktionen zwischen Gefrierschutzmittel und Protein erklärt werden.<sup>48</sup> In Tabelle 1.5 ist der jeweilige Effekt einiger Gefrierschutzmittel auf Proteine dargestellt.

**Tabelle 1.5** Eigenschaften von Kryoprotektoren ( nach Arakawa, 1990 <sup>48</sup>)

Kryoprotektor	Effekt des Kryoprotektors im gelösten Zustand auf Proteine
<b>Gruppe 1</b>	
Zucker (Sucrose, Glucose, Lactose)	stabilisierend
Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin, Prolin, Glutamat, Lysin, GABA)	stabilisierend
Glycerol	stabilisierend
Polyole (Xylitol, Mannitol, Inositol, Sorbitol)	stabilisierend
Amine (Betain, Sarcosin, Trimethylamin, N-Oxide)	stabilisierend
Salze (Phosphate, Na-Acetat, MgSO <sub>4</sub> , NaCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	stabilisierend
<b>Gruppe 2</b>	
Ethylenglycol	destabilisierend
Polyethylenglycol	destabilisierend
Dimethylsulfoxid	destabilisierend

Wie bereits erwähnt haben auch die osmotischen Eigenschaften der Kryoprotektoren nachteilige Effekte. Diese können jedoch mit Hilfe verschiedener Techniken abgemildert werden. So sollten die Konzentrationen an Kryoprotektoren in der die Zellen umgebenden Lösung nur schrittweise verändert werden, um den Zellen eine Anpassung an die osmotischen Verhältnisse zu erleichtern. Da die nach dem Auftauen erforderliche

Ausschleusung des Kryoprotektors aus den Zellen ebenfalls starke osmotische Belastungen für die Zellen mit sich bringt, hat sich die Zugabe von nicht-membrangängigen, osmotisch wirksamen Substanzen (Sucrose, Mannitol) in das Spülmedium bewährt.<sup>49</sup>

### 1.5.3 Ergebnisse bisheriger Versuche zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten

Trotz einiger Berichte über vereinzelte Erfolge bei der Verwendung von gefrorenem Material für die perforierende Keratoplastik, waren die Ergebnisse generell enttäuschend. 1963 zeigte Smith, daß Dimethylsulfoxid die Endothelzellen der Hornhaut beim Einfrieren effektiver schützt als Glycerol.<sup>50</sup> Müller gelangen unter Verwendung von Dimethylsulfoxid erfolgreiche Keratoplastiken beim Kaninchen. Er verwendete Hornhäute, die bei  $-79^{\circ}\text{C}$  noch am ganzen Bulbus verbleibend eingefroren und gelagert worden waren. Nach der Transplantation trübten die Spenderhornhäute ein, begannen aber nach einer postoperativen Phase von 2-4 Monate wieder klar zu werden. Erklärt werden konnten diese Beobachtungen nur durch eine im Falle des Kaninchen mögliche Regeneration des Hornhautendothels.<sup>51 52</sup> Untersuchungen, die den Berichten von Mueller und Smith folgten, konzentrierten sich stärker auf das Einfrieren von Korneoskleralscheiben, als auf das Einfrieren ganzer Bulbi. O'Neill gab die Methode ganze Augäpfel einzufrieren auf, da die Masse größer und damit der Wärmeaustausch geringer ist, als der einer isolierten Hornhaut mit ihrem Sklerarand.<sup>53</sup>

Es wurden zwei Methoden zur Gefrierkonservierung von isolierten Hornhäuten bei  $-196^{\circ}\text{C}$  unabhängig voneinander Mitte der sechziger Jahre zum einen von Capella, Kaufmann und Robbins<sup>54</sup> in den Vereinigten Staaten und zum anderen von O'Neill und Mueller<sup>53</sup> in England entwickelt. Von beiden Gruppen wurden histochemische Enzymfärbungen benutzt, um die Parameter der Gefrierkonservierung zu optimieren, eine Methode, die in ihrer Aussagekraft beschränkt ist. Beide Gruppen waren in der Lage, ihre Methoden durch klare Hornhäute in Transplantationsexperimenten wie auch in limitierten klinischen Versuchen zu rechtfertigen. Die Methode von Kaufmann und Capella erreichte sowohl im Zusammenhang mit Laboruntersuchungen als auch im

klinischen Gebrauch die meiste Aufmerksamkeit. Es ist nicht erforderlich die eingehenden Untersuchungen, die in den siebziger Jahren gemacht wurden, um die Methode nach Capella und Kaufmann besser einschätzen zu können, im Detail zu besprechen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß diese Technik die Integrität des Endothels nicht adäquat schützt.<sup>1</sup> Während die damit erreichten unbeständigen Ergebnisse bei Hornhauttransplantationen vor zwanzig Jahren adäquat waren, gilt dies nicht mehr für die heute erreichten hohen Erfolgsraten.<sup>55</sup>

Seit diesen frühen Experimenten sind zahlreiche Versuche unternommen worden, die Kryokonservierung von Hornhäuten zu verbessern. Es besteht allerdings nach wie vor das Problem, daß die signifikanten interindividuellen Unterschiede der Ergebnisse beim Einfrieren von Hornhäuten mit langsamen Kühlraten eine Vorhersage über die Qualität am Ende des gesamten Einfrierprozesses verhindert. Bevor diese hohe Variabilität nicht drastisch reduziert werden kann, ist die Kryokonservierung für die Anwendung durch Hornhautbanken kein geeignetes Verfahren.<sup>26</sup>

Die unbefriedigenden Ergebnisse, der Versuche der Kryokonservierung mit herkömmlichen Techniken haben manche Forscher veranlaßt, die Möglichkeiten einer alternativen Methode, nämlich die der Vitrifikation zu untersuchen.<sup>47</sup>

#### 1.5.4 Vitrifikation als Möglichkeit der Gefrierkonservierung

Im täglichen Umgang sind wir gewohnt, daß beim Abkühlen wäßriger Lösungen diese beim Unterschreiten ihres Gefrierpunktes erstarren und sich Eiskristalle bilden. Bei vielen bislang durchgeführten Versuchen zur Gefrierkonservierung von Zellen oder Geweben wurde der Versuch unternommen, durch eine Optimierung der Kühl- und Aufwärmraten diese gewebeschädigende Eiskristallbildung zu kontrollieren. Es besteht aber auch die Möglichkeit wäßrige Lösungen so schnell abzukühlen, daß für die Ausbildung von Eiskristallen keine Zeit bleibt. Dieser Vorgang wird als Vitrifikation bezeichnet. Hierbei werden wäßrige Lösungen in einen Glaszustand überführt. Der Glaszustand ist eine besondere Form des flüssigen Aggregatzustandes. Geeignete Lösungen verhalten sich dabei wie weit unter den Gefrierpunkt unterkühlte Flüssigkeiten sehr hoher Viskosität.

Die Glasübergangstemperatur (Kurzz.:  $T_g$ ), ist die Temperatur, bei der die Lösungen vom flüssigen Zustand in den glasigen Zustand übergehen oder umgekehrt. Ursächlich für das Phänomen der Glasübergangstemperatur ist die Reduktion der Brownschen Molekularbewegungen, d.h. die Bewegung der Moleküle wird so stark eingeschränkt, daß die Flüssigkeit die mechanischen Eigenschaften eines Festkörpers annimmt. Da die Übergänge in einem Temperaturbereich stattfinden, wird die Glasübergangstemperatur auch als Glasumwandlungsbereich oder Erweichungsbereich bezeichnet.<sup>56</sup> Innerhalb ihres Erweichungsbereichs sind die Gläser plastisch bzw. zähflüssig.

Gläser befinden sich nicht im thermodynamischen Gleichgewicht, weshalb sie im Laufe der Zeit Kristalle bilden können. Diese Kristallbildung geht von Eiskeimen aus, die sich beim Abkühlen gebildet haben, aber aufgrund der schnellen Abkühlung nicht weiterwachsen konnten. Je schneller die Lösung abgekühlt wird, desto weniger Keime bilden sich. Die Minimierung der Kristallbildung und die Stabilität des Glaszustandes hängen also von der Geschwindigkeit der Abkühlung ab.<sup>56</sup> Wegen der Instabilität des Glaszustandes und der gleichzeitigen Präsenz von Eiskeimen wird eine solche Phase als „doppelt instabil“ (double unstable glas) bezeichnet.<sup>35</sup>

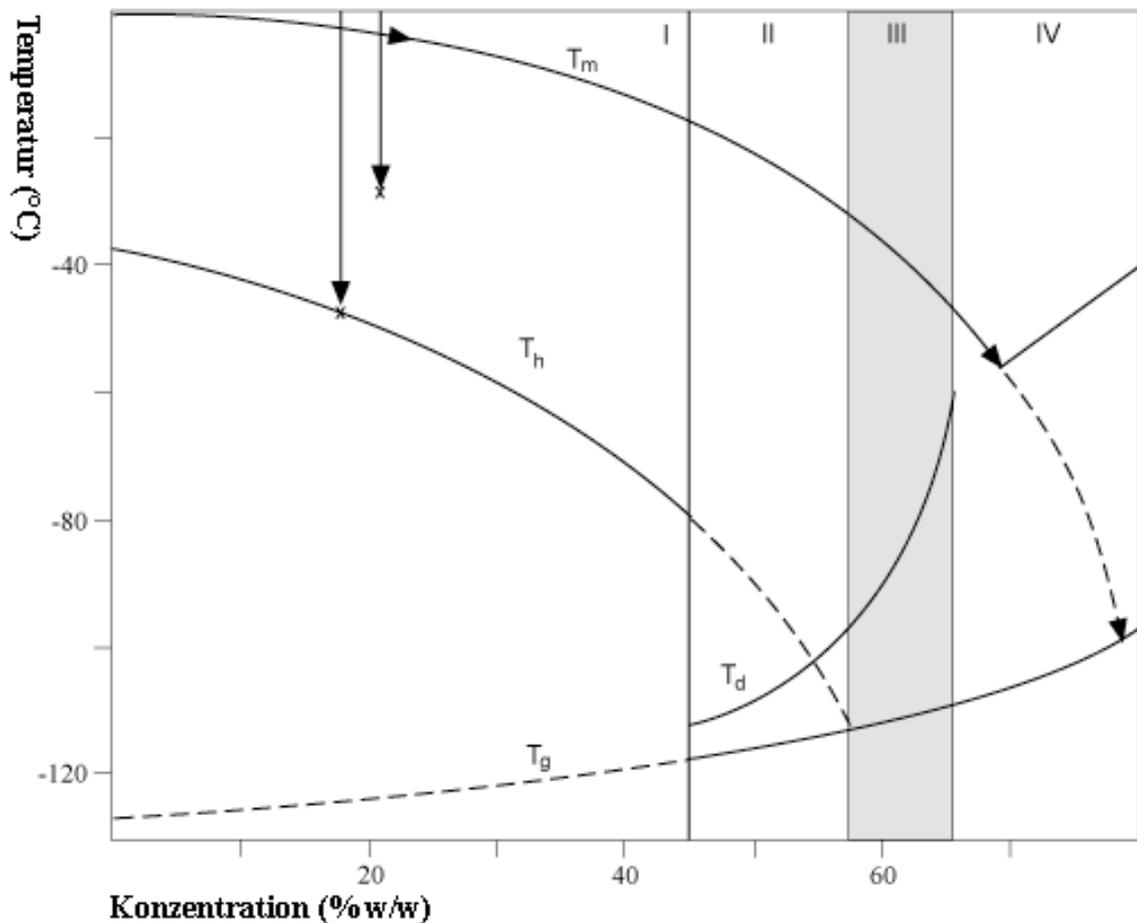
Um wäßrige Lösungen zu vitrifizieren bedarf es extrem schneller Abkühlung. Die Vitrifikation von signifikanten Mengen ist schwer zu erreichen.<sup>57</sup> Eine Vitrifikation von wäßrigen Lösungen bei Kühlraten, die in der Praxis erreichbar sind, ist daher nur durch Verwendung von Gefrierschutzmitteln möglich. Für die Vitrifikation sind erheblich höhere Konzentrationen an Gefrierschutzmitteln erforderlich, als bei den herkömmlichen Einfriertechniken. Ein besonderes Problem dieses Verfahrens stellt daher die erhöhte Toxizität der Kryoprotektoren dar.<sup>58</sup> 26

Um ein Organ erfolgreich zu vitrifizieren, ist es daher zunächst erforderlich, die effektive Menge an Kryoprotektoren zu verringern.

- Eine erfolgreiche Vitrifikation ist bei einigen Zelltypen dadurch erreicht worden, daß man eine Kombination verschiedener Kryoprotektoren benutzt hat, um eine ausreichende Gesamtkonzentration zu erreichen, ohne die Toxizitätsschwelle des einzelnen Gefrierschutzmittels zu überschreiten.<sup>45</sup>
- Eine weitere Möglichkeit der Reduzierung der Menge an Gefrierschutzmittel ergibt sich daraus, daß infolge der hohen Konzentrationen an Proteinen in den Zellen, die

eine intrazelluläre Eisbildung behindern, intrazellulär geringere Mengen an Gefrierschutzmittel benötigt werden, als im Extrazellularraum. Daher ist es möglich, die Menge des meist toxischen intrazellulären Kryoprotektors durch Zugabe eines kaum toxischen extrazellulären Gefrierschutzmittels zu verringern.<sup>59</sup>

- Ferner gibt es Substanzen, die bereits in sehr geringen Konzentrationen die glasbildenden Eigenschaften einer Lösung fördern. Zu diesen Substanzen gehört 1,2-Propanediol. Es ist für die Zellen toxisch, wenn es in Konzentrationen über 10% eingesetzt wird. Die Zugabe kleiner Mengen ermöglicht jedoch die Reduktion der im übrigen verwendeten Gefrierschutzmittel.<sup>59</sup>
- Darüber hinaus kann die Toxizität von Kryoprotektoren deutlich vermindert werden, wenn bei der stufenweisen Zugabe und Ausschleusung die Expositionszeiten gegenüber den mittleren Konzentrationsstufen verkürzt werden, ohne daß die Expositionszeit gegenüber der Höchstkonzentration reduziert wird.
- Da sich die toxischen Wirkungen bei Erniedrigung der Temperatur verringern, sollte man Maßnahmen ergreifen, um die Gefrierschutzmittel schnell und unmittelbar nach dem Auftauen zu entfernen. Jedoch wirken die intrazellulären Kryoprotektoren auch bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt noch toxisch. Eine Möglichkeit einen Teil dieser Schädigung zu vermeiden, besteht in der Zugabe von „Toxizitäts-Neutralisatoren“. Ein Beispiel dafür ist Formamid, das zur Neutralisation der toxischen Wirkungen von Dimethylsulfoxid eingesetzt wird.
- Die Wirkung von Kryoprotektoren kann auch durch eine Druckerhöhung während des Abkühlens verstärkt werden. Die Druckerhöhung sorgt für eine Anhebung der Glasübergangstemperatur und für eine erst bei tieferen Temperaturen einsetzende Kristallbildung. Wenn beim Abkühlen eine Temperatur unterhalb der Glasübergangstemperatur erreicht worden ist, kann der Druck ohne die Gefahr einer Kristallisation wieder gesenkt werden. Signifikante Effekte konnten bei Drücken von 1000 atm nachgewiesen werden.



**Abbildung 3** Abhängigkeit des Gefrierpunktes, der Kristallisation, der Glasübergangstemperatur und der Devitrifikation einer wässrigen Lösung von der Temperatur und der Konzentration eines hypothetischen Gefrierschutzmittels (nach Fahy 1984)

In seiner Arbeit „Vitrification as an Approach to Cryopreservation“ erläuterte Fahy das Konzept der Vitrifikation anhand des in Abbildung 3 wiedergegebenen Diagramms. In diesem Diagramm wird die Abhängigkeit des Gefrierpunktes, der Kristallisation, der Glasübergangstemperatur und der Devitrifikation einer wässrigen Lösung von der Temperatur und der Konzentration eines hypothetischen Gefrierschutzmittels dargestellt. Dabei werden vier Konzentrationsbereiche (I-IV) unterschieden. Mit  $T_m$  ist die Kurve entlang des Gefrier- bzw. Schmelzpunktes gekennzeichnet.  $T_h$  beschreibt die Kurve entlang einer Temperatur, bei der es zur Kristallbildung kommt. Lösungen kühlen normalerweise bis zu einem Punkt ab, der zwischen  $T_m$  und  $T_h$  liegt, bevor sie

augenblicklich Kristallisationskerne bilden, bzw. beginnen einzufrieren. Dieser Punkt ist im Diagramm durch ein X dargestellt.  $T_g$  ist die Glasübergangstemperatur, bei der tiefgekühlte Flüssigkeiten vitrifizieren.

Im Bereich I des Diagramms ist das Einfriermedium verhältnismäßig stark verdünnt. Eine Vitrifikation ist in diesem Bereich praktisch unmöglich, da eine Eisbildung unvermeidbar ist. In dem Bereich II, in dem eine höhere Konzentration an Kryoprotektoren vorliegt, ist sowohl die Kristallbildung, als auch das Wachstum von Kristallen gehemmt. Es ist möglich Proben, in einem Konzentrationsbereich, in dem  $T_h$  20-40 Grad Celsius über  $T_g$  liegt, auch unter den Bereich der Kristallbildung abzukühlen, ohne daß die Probe gefroren erscheint. Dabei erhält man doppelt unbeständiges Glas. Normalerweise kommt es beim Erwärmen von doppelt unbeständigem Glas zum Kristallwachstum. Dieser Umstand und die Unmöglichkeit Proben von der Größe von Organen schnell genug abzukühlen, ohne daß es bei diesen Konzentrationen zur Eisbildung kommt, macht doppelt unbeständiges Glas scheinbar unbrauchbar für die Organkonservierung.

Bei noch höheren Konzentrationen (Region III) nimmt  $T_h$  gleiche Werte wie  $T_g$  an und fällt dann sogar unter die  $T_g$ -Werte. In dieser Region ist es möglich auch größere Flüssigkeitsmengen langsam bis zu  $T_g$  abzukühlen, ohne daß es zur Eisbildung kommt. Der Schnittpunkt von  $T_g$  mit  $T_h$  stellt daher die niedrigste Konzentration an Kryoprotektoren dar, die für die Organkonservierung verwendet werden sollte.

Obwohl es möglich ist, Organe in diesem Konzentrationsbereich zu vitrifizieren, ohne daß es zu einer makroskopisch sichtbaren Eisbildung kommt, tritt die Eisbildung dann bei der anschließenden Wiedererwärmung auf. Diese Eisbildung beruht auf dem Wachstum von Kristallkeimen, die sich bereits während des Abkühlens gebildet haben. Die Eismenge, die sich während des Abkühlens bildet, ist jedoch sehr gering und es ist möglich Organe in diesem Konzentrationsbereich so schnell zu erwärmen, daß jeglichem nennenswertem Wachstum des vorbestehenden Eises vorgebeugt werden kann.

In der Region IV wird eine Kristallbildung schließlich schon bei geringen Kühl- und Aufwärmraten verhindert. Hier kommt es zu keinerlei Eisbildung. Obwohl dieser Bereich prinzipiell als ideal für die Organkonservierung erscheint, führen die sehr

großen Probleme der Toxizität der Kryoprotektoren in diesen Konzentrationsbereichen dazu, daß die Region III von größtem Interesse für die Organkonservierung ist.

Angenommen, die erfolgreiche Vitrifikation eines Organs wäre möglich, müßte das Organ vor seiner Verwendung als Transplantat noch wiedererwärmt werden. Leider kann es auch beim Wiedererwärmen zuvor vitrifizierter Lösungen zur Kristallbildung, sowie zur Rekristallisation, dem Verschmelzen von kleinen Kristallen zu großen kommen.<sup>35</sup> Dieser Vorgang wird Devitrifikation genannt.  $T_d$  beschreibt in der Graphik die Temperatur, bei der es zum Vorgang der Devitrifikation kommt. Die Devitrifikation schädigt durch die bereits erwähnten Mechanismen der Eisbildung und der Erhöhung der intrazellulären Lösungskonzentration. Sie ist deshalb unerwünscht.

Die Definition der Devitrifikation, die von Luyet und seinen Mitarbeitern eingeführt wurde, unterscheidet sich leicht von derjenigen, die heute gewöhnlich verwendet wird. In der Definition nach Luyet wird nur von Devitrifikation gesprochen, wenn die Probe am Anfang des Aufwärmprozesses 100% vitrifiziert war. Inzwischen wird der Begriff umfassender verwendet, wobei die Kristallisation von Proben während des Erwärmens mit eingeschlossen ist, die zuvor teilweise kristallisiert waren, solange die Gesamtzahl der Partikel während des Erwärmens signifikant und kontinuierlich ansteigt.<sup>60</sup>

Fahy bezeichnete 1984 die Devitrifikation als das größte Hindernis auf dem Weg zur erfolgreichen Kryokonservierung.<sup>61</sup>

Theoretisch besteht aber die Möglichkeit, die Devitrifikation zu verhindern. Erfolgt die Erwärmung schnell genug, so geht die Substanz vom glasartigen in den unterkühlten und von dort direkt in den flüssigen Zustand über.

Daher ist ein möglichst schnelles Erwärmen nach kompletter Vitrifikation erforderlich, um den Temperaturbereich großer Kristallwachstumsgeschwindigkeiten schnell zu durchfahren.<sup>35</sup>

Devitrifikation kann den Tod, aber auch das Überleben der Zellen zur Folge haben. Beim Vergleich der Aufwärmraten, die benötigt werden, um das biologische Überleben zu erlauben mit denen, die notwendig sind, um eine Devitrifikation in Gefrierschutzmittel-Wasser-Lösungen zu unterdrücken, wurde beobachtet, daß für den ersten Vorgang deutlich niedrigere Aufwärmraten benötigt werden, als für den zweiten.<sup>61</sup>

Daß eine praktische Umsetzung dieser theoretischen Überlegungen zu Vitrifikation und Devitrifikation möglich ist, konnte durch Versuche an verschiedenen Zellen und Geweben gezeigt werden. Die erste Veröffentlichung über die erfolgreiche Vitrifikation eines biologischen Systems stammt vermutlich von Rapatz und Luyet aus dem Jahr 1968. Ihnen gelang die Gefrierkonservierung von Erythrozyten ohne erkennbare Eisbildung unter Verwendung von Glycerol als Gefrierschutzmittel.<sup>61 62</sup>

Ein weiterer Erfolg war die Vitrifikation von Mäuseembryonen durch Rall und Fahy im Jahr 1985. Für ihren Versuch hatten sie das Vitrifikationsmedium VS1 (vitrification solution no. 1) benutzt, eine Mischung aus Dimethylsulfoxid, Acetamid, Propylenglycol und Polyethylenglycol.<sup>63</sup>

Neben den beiden genannten Beispielen liegen auch Untersuchungen über die Vitrifikation von Langerhans-Inseln, menschlichen Monozyten und Oozyten vor.<sup>61</sup>

Zusammenfassend ist zu sagen, daß auch die Vitrifikation, wie bereits für das Einfrieren unter relativ geringen Kühlraten beschrieben, bislang nur bei einzelnen Zellen, kleinen Zellverbänden oder Embryonen gelungen ist. Eine Konservierung von Organen, wie z.B. der Niere oder Leber, mit Hilfe der Vitrifikation ist derzeit nicht möglich.

Die Hornhaut ist aufgrund ihrer geringen Größe und der guten Erreichbarkeit ihrer oberflächlichen Zellen theoretisch gut für eine Vitrifikation geeignet.<sup>55</sup> Dennoch gibt es bislang nur wenige Arbeiten über Vitrifikationsversuche von Hornhäuten.<sup>61 64 65 46</sup>

Dazu gehört der Bericht Bournes von 1986 über eine anscheinend erfolgreiche Vitrifikation menschlicher Hornhäute bei Einsatz von 90%igem Glycerol.<sup>61</sup> Das Ergebnis war insofern unbefriedigend, da inter- und intrazelluläre Vakuolen auftraten. Das Endothel behielt jedoch seine Integrität für eine längere Zeit in der Kultur und bestand den Test durch die Vitalfärbung. Es gab keine Anzeichen für einen Unterschied im Grad der Schädigung zwischen vitrifizierten Hornhäuten und solchen, die dem Glycerol ohne Vitrifikation ausgesetzt worden waren. Bourne benutzte eine Kühlrate von 1°C/min, wofür er ein steuerbares Einfriergerät benutzte. Leider konnten diese anfänglich positiven Ergebnisse bei der anschließenden Transplantation von ähnlich konservierten Hornhäuten nicht bestätigt werden, da die Hornhäute keine ausreichende Funktion zeigten. Nach Fahy ist dies jedoch nicht weiter verwunderlich im Blick auf die extrem und unnötig hohen Konzentrationen von Glycerol.<sup>61</sup>

Armitage verwendete 1989 das Vitrifikationsmedium VS1, das Rall und Fahy mit Erfolg für die Vitrifikation von Mäuseembryonen eingesetzt hatten, bei Versuchen mit Kaninchenhornhäuten. Es zeigte sich, daß die Hornhäute zwar eine 15 minütige Exposition gegenüber 90% VS1 bei  $-5^{\circ}\text{C}$  tolerierten,<sup>42</sup> und daß die Vitrifikation der Hornhäute gelang, jedoch entstanden bei der Vitrifikation Risse in der Probe und beim Erwärmen kam es zur Devitrifikation. Nach dem Auftauen und der Entfernung des Gefrierschutzmittels lag das Endothel zwar noch der Descemetschen Membran auf, aber die Zellkontakte waren zerstört. Das Endothel zeigte nach dem Auftauen keine Funktion mehr und die Hornhäute quollen bei den anschließenden Perfusionsversuchen.<sup>64</sup>

Bourne versuchte 1994 nochmals eine Vitrifikation der Hornhaut zu erreichen. Bei diesen Versuchen benutzte er nicht mehr Glycerol, sondern das Vitrifikationsmedium VS41a. Das Medium war aus den Gefrierschutzmitteln Dimethylsulfoxid, 1,2-Propandiol, Formamid und Chondroitinsulfat zusammengesetzt. Zunächst testete er die Toxizität von VS41a. Dazu exponierte er die Hornhäute gegenüber VS41a in auf- und absteigenden Konzentrationen bei  $0^{\circ}\text{C}$  und einer Expositionsdauer von 10 Minuten pro Schritt. Dabei kam es zu einem Endothelzellverlust von nur 4,3%. Der anschließende Vitrifikationsversuch mit drei Hornhäuten unter Verwendung verschiedener Kühlraten ( $2-45^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) bis zu einer Temperatur von  $-130^{\circ}\text{C}$  führte bei allen Hornhäuten zur Eisbildung im Bereich der Sklera und der dickeren peripheren Hornhaut. Während des Erwärmens kam es bei zwei Hornhäuten zur kompletten Eisbildung. Nur eine Hornhaut war sowohl beim Einfrieren, als auch beim Auftauen im Zentrum klar geblieben. Jedoch war es bei dieser Hornhaut zur Reißbildung im Gefriergut gekommen. Dennoch zeigte diese Hornhaut bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung in einem Bereich von 36% der gesamten Zellfläche lebende Endothelzellen. Bei den beiden anderen Hornhäuten überlebten 5% bzw. 0% der Endothelzellen den Versuch. Eine Expositionszeit von 25 Minuten verhinderte zwar stets die Eisbildung in den Hornhäuten führte aber schon im Vorfeld zu nicht akzeptablen toxischen Schäden.<sup>46</sup>

Die dargestellten Untersuchungen lassen erkennen, daß die toxischen Effekte der in hohen Konzentrationen benötigten Kryoprotektoren und die Schwierigkeiten diese Konzentrationen auch im Gewebe zu erreichen, einen Fortschritt bei Anwendung der Vitrifikation bisher blockiert haben.<sup>47 58</sup>

Trotz der noch beachtlichen Probleme, die zu lösen sind, hält Fahy es für möglich mit Hilfe dieser Methode das Ziel einer erfolgreichen Kryokonservierung von Hornhäuten eher zu erreichen, als mit der herkömmlichen Methode des Einfrierens.<sup>59</sup>

Auf dem Wissensstand von 1987 hält Fahy folgende Schlußfolgerungen für begründet:<sup>61</sup>

- Vitrifikation ist ein unschädliches Ereignis für lebende Zellen ohne Rücksicht auf die Kühlrate.
- Die Toxizität der Kryoprotektoren und die Devitrifikation sind vermutlich die einzigen Quellen einer Schädigung, vorausgesetzt, daß der Vermeidung einer osmotischen Schädigung der Zellen angemessene Aufmerksamkeit geschenkt wird.
- Vitrifikation ist auf eine große Menge verschiedener Zelltypen und auf Zellen verschiedener Spezies anwendbar.

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Gefrierkonservierung von Hornhäuten konnte sich bislang nicht als Routineverfahren zur Konservierung von Hornhäuten durchsetzen.<sup>66</sup> In der Literatur werden dafür zwei Gründe angegeben:

- große Schwankungen der Überlebensrate von Endothelzellen nach Gefrierkonservierungen<sup>26</sup>
- hoher technischer Aufwand<sup>67</sup>

Die Methode zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten bedarf folglich weiterer Verbesserungen und Vereinfachungen.

Die zahlreichen theoretischen Vorteile der Vitrifikation gegenüber dem konventionellen Einfrieren unter Verwendung langsamer Kühlraten waren Anlaß für die Entscheidung, das Konzept der Vitrifikation in der hier vorgestellten Studie weiter zu verfolgen.

Dabei wurde die bereits von Bourne benutzte Vitrifikationslösung VS41a verwendet, weil VS41a bei Exposition gegenüber Hornhäuten zu einem Verlust von nur 4,3% der Endothelzellen geführt hatte. Als nachteilig hatte es sich für Bourne beim Versuch des Einfrierens bis  $-130^{\circ}$  Celsius erwiesen, daß es teilweise zur Rißbildung im Gefriergut

und zur Eisbildung im dickeren Randbereich der Hornhaut gekommen war. Daraus hatte Bourne gefolgert, daß in den dickeren Bereichen der Hornhäute die notwendige Konzentration an Kryoprotektoren nicht erreicht worden war. Eine längere Exposition gegenüber den Gefrierschutzmitteln war jedoch von den Endothelzellen nicht toleriert worden.<sup>46</sup>

Ein Leitgedanke für die Entwicklung einer verbesserten Methode war es daher, die Masse des einzufrierenden Gewebes weiter zu reduzieren. Je kleiner das Volumen des Gewebeverbandes ist, um so schneller können die Kryoprotektoren in das Gewebe eindringen. Die Expositionszeiten gegenüber den Kryoprotektoren müßten auf diese Weise verringert werden können. Zudem ermöglicht eine Reduktion an Gewebe ein schnelleres und besser kontrolliertes Einfrieren und Erwärmen des Gewebes.

In dieser Arbeit wurden daher zum ersten Mal hintere Hornhautlamellen für Einfrierversuche verwendet, die nur 11,7% des Volumens der bisher gefrierkonservierten Korneoskleralscheiben besitzen. Operationstechniken für die Durchführung einer Keratoplastik mit hinteren Hornhautlamellen sind bereits entwickelt worden, so daß die Konservierung von hinteren Hornhautlamellen von klinischer Bedeutung ist.

Jedoch schienen auch die von Bourne gewählten Kühlraten von 2-45° Celsius/Minute, die er mit einer programmierbaren Kühlkammer erzeugt hatte, im Widerspruch zu dem von Fahy vorgeschlagenen Vorgehen bei Vitrifikationsversuchen zu stehen. Fahy hatte darauf hingewiesen, daß die Vitrifikation auf der einen Seite maximale Kühlraten erfordert. Auf der anderen Seite sollte das Gefriergut zu Beginn des Einfrierens nur bis zu einer Temperatur kurz unterhalb der Glasübergangstemperatur (ca.-140°) abgekühlt werden, da andernfalls Rißbildungen im Gefriergut aufgrund des thermischen Stresses zu befürchten seien.<sup>59</sup> Für die Abkühlung kamen daher weder das direkte Einbringen des Gefriergutes in flüssigen Stickstoff (-196°C), noch die Verwendung programmierbarer Einfrierautomaten in Frage, da diese nur eine maximale Kühlrate von 40° C/min ermöglichen. Für die angestrebte Methodenverbesserung war somit die Entwicklung einer geeigneten Einfriervorrichtung erforderlich.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Einfrierbehälters für Hornhautlamellen. Er sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- minimales Volumen der Kammer, um möglichst kurze Einfrier- und Auftauzeiten zu ermöglichen
- ausreichende Stabilität
- leichte Handhabung (einfacher Verschlußmechanismus; unkompliziertes Einlegen und Herausnehmen der Hornhautlamelle)
- keine mechanische Schädigung bei Kontakt zwischen Endothel und Gefäßwand
- Möglichkeit für die Beobachtung der Hornhautlamelle während des Abkühlens und Auftauens

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es also, durch Verwendung von hinteren Hornhautlamellen, den Aufbau einer geeigneten Einfriervorrichtung und die Entwicklung eines Gefriergutbehälters, das Verfahren zur Vitrifikation von Hornhautlamellen weiter zu optimieren. Als Qualitätskriterium für die entwickelte und angewandte Methode wurde die lichtmikroskopische Befundung des Endothels mittels Vitalfärbung gewählt.