

A. Analyse der aktuellen klinischen Situation

1. Einleitung: aktuelle Situation der Hornhauttransplantation

Im Jahr des Verfassens dieser Arbeit jährt sich die Erstbeschreibung einer menschlichen Hornhautübertragung zum 100sten mal (durchgeführt 1905, veröffentlicht 1906; Zirm 1906). Lässt man die Bluttransfusion außer Betracht, ist die Hornhaut das erste erfolgreich übertragene humane Gewebe. Gleichzeitig ist sie auch das am häufigsten transplantierte menschliche „Organ“. Für die USA werden Operationszahlen von 44.000 Transplantationen jährlich angegeben, in Deutschland werden 4000 –5000 Transplantationen im Jahr vorgenommen. Die Verbesserung der chirurgischen Technik und die verbesserte Spenderaquisition und Transplantatbereitstellung durch Einführung von Hornhautbanken haben wesentlich zu dieser Entwicklung beigetragen.

Dennoch gibt es große Unterschiede hinsichtlich der Bewertung des Erfolges dieser Transplantationsform. Zum einen ist bei günstiger Ausgangssituation eine praktisch vollständige visuelle Rehabilitation möglich –beispielsweise sind nach homologer Keratoplastik bei Keratokonus durchaus Visusergebnisse von 1,0 möglich- zum anderen wird das Langzeit-Transplantatüberleben weiterhin in hohem Maß durch Immunreaktionen bedroht, die in manchen Hochrisikosituationen die Wahrscheinlichkeit eines längerfristigen klaren Transplantatüberlebens gegen Null gehen lassen können. Die zweite schwerwiegende Bedrohung für das Langzeit-Transplantatüberleben ist der schleichende, chronische Endothelzellverlust, dessen Natur bis heute nicht vollständig geklärt ist. Die 10-Jahres-Überlebensrate des Hornhauttransplantates wird in einer australischen Analyse mit ca. 60 % angegeben (Coster 2000 + 2004); demgegenüber wurden z.B. für Nierentransplantate bereits 1994 5-Jahres-Überlebensraten bis zu 90 % erreicht (Opelz 1994).

Inhalt und Ziel dieser Arbeit sollen daher aktuelle Ansätze zur Prophylaxe der Immunreaktion sein. Die Zusammenstellung beginnt mit Untersuchungen zur aktuellen klinischen Situation und schließt Daten ein, die am Kollektiv der Keratoplastik-Patienten unserer Klinik erhoben wurden. Im zweiten Abschnitt werden Untersuchungen zur lokalen Anwendbarkeit von neuen Immunsuppressiva vorgestellt. Der breite klinische Einsatz der Immunsuppressiva ist ja weiterhin durch die teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen bei systemischer Applikation limitiert. Bei den untersuchten Substanzen handelt es sich dabei um Mycophenolat Mofetil (MMF) sowie um Sirolimus und Everolimus. Im 3. Abschnitt

schließlich werden gentherapeutische Ansätze zur Verbesserung der Prognose der Keratoplastik und zur Prophylaxe der Immunreaktion dargestellt. Eigene Untersuchungen umfassen dabei die Transfektion des kornealen Endothels mit dem Gen des T_{H2}-Cytokins Interleukin-10.

1.1. Klinische Verlaufsformen der Immunreaktion

Die Transplantatdekompensation stellt die häufigste Ursache für einen Misserfolg nach der Keratoplastik dar. Akut und chronisch verlaufende Immunreaktionen tragen wesentlich zur vorzeitigen Dekompensation des Spendergewebes bei. In einer Analyse von Vail aus dem Jahr 1996 wurden unter 201 dekompenzierten Transplantaten Abstoßungsreaktionen mit 34% als häufigste Ursache gefunden (Vail 1996). Besonders in der Hochrisikosituation wird die Abstoßungsrate mit bis zu 50% und darüber angegeben und liegt damit teilweise höher als bei der Transplantation solider Organe. Die immunologischen Mechanismen der Transplantatabstoßung sind komplex und werden in der vorliegenden Arbeit in Teil B und C näher dargestellt. Zur Einführung in die Thematik soll hier zunächst ein Überblick über die klinischen Formen der Immunreaktion gegeben werden.

Klinische Formen der Transplantatreaktion

Die Erkennung des Spendergewebes als Fremdgewebe durch das Immunsystem des Empfängers erfolgt auch für die Kornea ebenso wie bei anderen Organen über HLA-Antigene (Human Leukocyte Antigens). Für die Hornhaut konnte eine differenzierte Verteilung dieser Proteine im Epithel, Stroma und Endothel nachgewiesen werden (Mayer 1983). Daraus erklärt sich, dass alle Anteile der Hornhaut isoliert oder – zeitlich versetzt nacheinander – Ziel einer spezifischen Transplantatabstoßung sein können.

Für jede Art der Immunreaktion gilt, dass sie im (nichtvaskularisierten) Ersttransplantat nicht vor Ablauf von 7-14 Tagen beobachtet werden kann. Diese zeitliche Verzögerung gegenüber akuten Transplantatabstoßungen vaskularisierter Organe erklärt sich –kurz gesagt- durch die komplexe Immunbiologie der Keratoplastik. Diese schließt Besonderheiten der Antigenerkennung, -prozessierung und -sensibilisierung ein (Coster 2004, Yamagami 2001), auf die in Abschnitt B noch genauer eingegangen wird.

Eine allgemein gültige Nomenklatur für die verschiedenen Formen der Abstoßung gibt es nicht, eine morphologische Einteilung nach folgendem Muster ist jedoch klinisch sinnvoll:

- Epitheliale Abstoßung
- Subepitheliale Infiltrate
- Stromale Abstoßung
- Endotheliale Abstoßung: fokal
 diffus

Epitheliale Immunreaktionen

Diese Form der Immunreaktion wird mit einer Häufigkeit von 1-10% als relativ selten angegeben (Allredge 1981, Pleyer 1990, Severin 1986). Da das Spenderepithel bereits frühzeitig nach dem Eingriff ersetzt wird, werden die meisten Reaktionen innerhalb der ersten Wochen beobachtet. Jedoch traten auch noch 18 Monaten nach Transplantation epitheliale Immunreaktionen auf und belegen damit den in Ausnahmesituationen langen Verbleib des Spenderepithels (Pleyer 1990, Severin 1986). Klinisch zeigen sie sich als fluoreszeinpositive, leicht erhabene Migrationslinie, die typischerweise am Transplantatrand beginnt. Ähnlich der am Endothel auftretenden „Khodadoust-Linie“ bei endothelialer Abstoßung bewegt sie sich als Nekrosezone innerhalb mehrerer Tage über das Transplantat.

Die isoliert auftretende, epitheliale Reaktion ist in der Regel unproblematisch. Sie wird vermutlich in vielen Fällen übersehen, da sie asymptomatisch verläuft. Mögliche Komplikation und gleichzeitig auch Differenzialdiagnosen sind (Re)-epithelisierungsstörungen, die beide durch reichlich Tränensubstitution behandelt werden können. Ein „Triggern“ von Immunreaktionen in tieferen Anteilen des Transplantates wird durch epitheliale Immunreaktionen nur selten beobachtet (Allredge 1981, Pleyer 1992).

Epitheliale, z.T. ebenfalls linienförmig imponierende Veränderungen können nach Transplantation auch bei einer Vielzahl weiterer Ursachen beobachtet werden. Da das Transplantatepithel durch den Spender allmählich ersetzt wird, muss grundsätzlich mit einer „Epithelunruhe“ gerechnet werden, die durch eine Reihe weiterer Faktoren noch gefördert werden kann. Am häufigsten werden Epitheliopathien durch Benetzungsstörungen verursacht. Nahtspannung, unzureichende Tränenproduktion, z. B. bei rheumatologischen Grundleiden, und veränderte Tränenfilmmzusammensetzung (Blepharitis, Verätzung, Pemphigoid) müssen berücksichtigt werden. In der Regel gibt die Anamnese bereits Hinweise auf besonders gefährdete Patienten. Klinisch sind Oberflächenveränderungen oft therapieresistent und bleiben ortsständig. Häufig werden sie im Bereich des Lidkontaktes beobachtet und weisen im Gegensatz zur Immunreaktion keine „Migration“ auf. Besonders ausgeprägte Verläufe lassen sich vor allem bei Patienten mit chronischem Hautekzem beobachten.

Eine wichtige Differenzialdiagnose mit völlig anderen therapeutischen Konsequenzen stellt die Herpes-Keratitis (ausgelöst durch HSV (Herpes-simplex-Virus) im Transplantat dar. Auch sie beginnt überwiegend am Transplantatrand. Ein einfaches, wichtiges Kriterium ist das Zeitintervall nach Keratoplastik. Im Falle einer HSV – Reaktivierung aus dem betroffenen

Ganglion muss die Reinnervation im Spendergewebe erfolgt sein. Dies ist jedoch nicht vor 3-6 Monaten nach Transplantation zu erwarten.

Subepitheliale Infiltrate (SEI)

Diese Form der Abstoßungsreaktion ist ebenfalls eher selten (Krachmer 1978). Angaben zur Häufigkeit schwanken zwischen 2-15 % (Allredge 1981, Severin 1986, Pleyer 1990). Die nummuliartigen Infiltrate im anterioren Stroma sind streng auf das Transplantat begrenzt und häufig disseminiert verteilt.

Das äußerlich reizfreie Auge weist meist keine Visusminderung auf, führt daher beim Patienten nur selten zu Symptomen und äußert sich ggf. lediglich als Photophobie. In der Keratoplastiknachsorge werden SEI meist als „Zufallsbefund“ im späteren Verlauf beobachtet. Bereits 1990 wurde gezeigt, dass diese Reaktionsform in einer weiten Zeitspanne von 2 – 24 Monaten postoperativ auftreten kann (Pleyer 1990).

Inwieweit Risiken für funktionell bedrohliche Immunreaktionen von SEI ausgehen, ist nicht sicher bekannt. Den meisten Beobachtungen zufolge sind sie vollständig reversibel.

Allerdings wurden auch zeitlich im Zusammenhang stehende, endotheliale Immunreaktionen beobachtet. Zumindest eine intensiviertere lokale Behandlung mit Steroiden und kurzfristige Beobachtung wurden empfohlen (Allredge 1981).

Ebenso wie bei adenoviral ausgelöster Keratokonjunktivitis sind die umschriebenen, subepithelial gelegenen Infiltrate morphologisch durch Lymphozyten und Makrophagen-Ansammlungen verursacht. Die begleitenden Befunde mit Karunkelschwellung, Lymphadenopathie und Übergreifen der Infiltrate auf die Wirtshornhaut und –bindehaut lassen eine Abgrenzung der viralen Infektion klinisch relativ einfach zu.

Stromale Immunreaktionen

Diese Form der Transplantatabstoßung kann als Rarität betrachtet werden. Lediglich 1-2% aller Immunreaktionen wurden in größeren Untersuchungen als typische, akut einsetzende, „durchgreifende“ Trübung beobachtet. Die stromale Immunreaktion beginnt ebenfalls überwiegend am peripheren Transplantatrand und schreitet anschließend rasch nach zentral fort (Khodadoust 1969).

Da das Endothel bei dieser Reaktion nahezu immer mitbetroffen ist, kann sie oft nur schwierig von der endothelialen Abstoßung abgegrenzt werden.

Erst die unverzüglich eingeleitete Therapie, die zum Stillstand der Stromalen Eintrübung führt und das Transplantat aufklaren lässt, erlaubt es, die Diagnose zu stellen. Bei histologischer Untersuchung wurden überwiegend T- und B-Lymphozyten nachweisbar. Eine wichtige Differenzialdiagnose stellt die Stromale Hornhauteinschmelzung bei rheumatoider Arthritis im Transplantat dar (Pleyer 2002). Die Prognose beider klinischer Manifestationen wird auch bei rasch begonnener Steroidtherapie als kritisch angesehen. Ein Transplantataustausch ist häufig notwendig und sollte möglichst im reizfreien Zustand erfolgen.

Endotheliale Immunreaktionen

Diese Gruppe der Immunreaktionen stellt die am häufigsten vorkommende und durch die Gefahr der dauerhaften Visusminderung wichtigste Form der Abstoßung dar. Sie treten mit vielfältigen klinischen Veränderungen in Erscheinung und werden in der Literatur nicht einheitlich differenziert. Nach Severin lassen sich folgende Formen unterscheiden (Severin 1986):

- Fokale endotheliale Reaktion

Diese Reaktion weist die „klassische“ endotheliale „Khodadoustlinie“ auf (Khodadoust 1969) (Abbildung 1). Auch diese Reaktionsform beginnt häufig am Transplantatrand – oft im Bereich angrenzender Vaskularisation oder anteriorer Synechien (Arentsen 1983). Innerhalb weniger Tage wandert die Migrationsfront bestehend aus Lymphozyten und Makrophagen über das Spenderendothel. Das betroffene Endothel ist morphologisch durch Ödem und Verlust der „Tight junctions“ verändert. Die Descemetmembran wird völlig freigelegt, und der postinflammatorische Heilungsverlauf ist deutlich verzögert (Khodadoust 1969). Im durchwanderten Bereich tritt durch das zerstörte Endothel ein Stromaödem auf. In der Vorderkammer lässt sich z.T. bereits als Vorbote der Reaktion oder begleitend eine zelluläre Infiltration beobachten (Musch 1991).

Die endotheliale „Khodadoustlinie“ wird zwar als pathognomonisch für eine fokale endotheliale Reaktion angesehen, nicht selten treten jedoch begleitend diffuse Endothelpräzipitate auf.

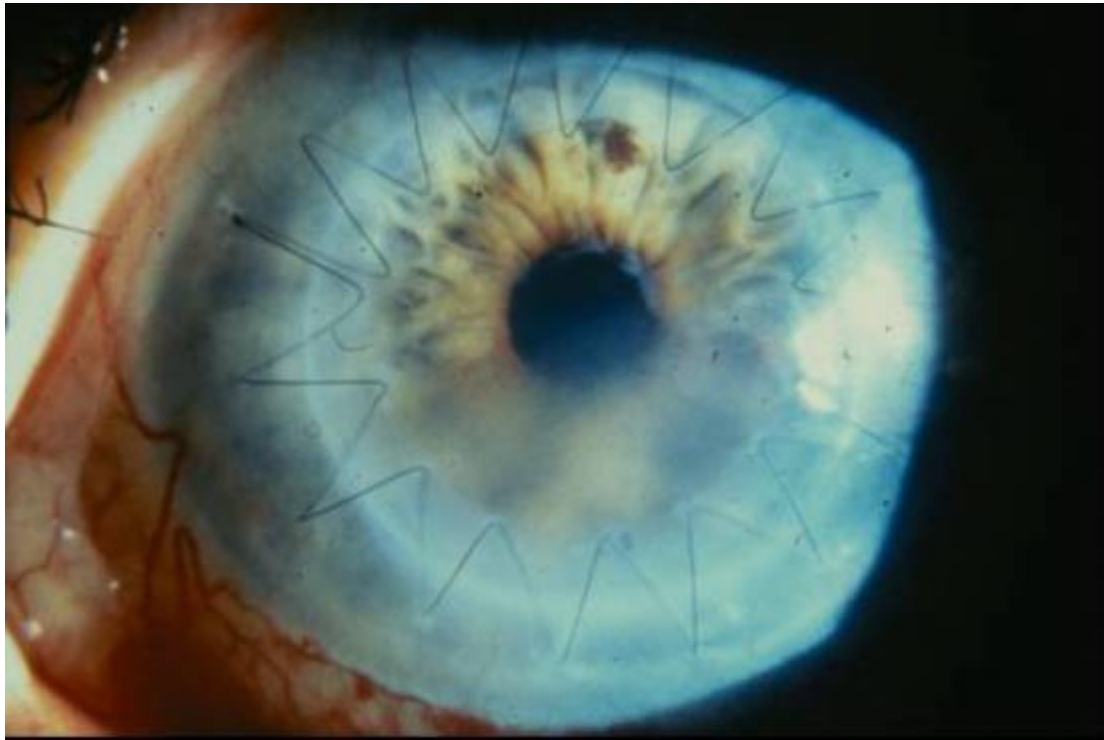


Abbildung 1: fokale endotheliale Immunreaktion

Diese Kombination wurde von einigen Autoren häufiger als die isolierte Form beobachtet. In der bisher umfangreichsten Nachbeobachtung von 869 Patienten konnte Arentsen insgesamt 77 fokale, endotheliale Reaktionen erfassen – bei mehr als der Hälfte der betroffenen Patienten (55%) lagen endotheliale Präzipitate ohne eine Migrationslinie vor (Arentsen 1983). Andererseits können Präzipitate als Vorläufer einer Reaktion mit nachfolgender Khodadoustlinie beobachtet werden (Pleyer 1990, Severin 1986).

Die fokale endotheliale Immunreaktion tritt häufig relativ früh, d.h. postoperativ innerhalb der ersten 6 Monate auf. Frühe Reaktionen wurden insbesondere bei großem Transplantatdurchmesser und Neovaskularisation des Spendergewebes beobachtet (Arentsen 1983).

· Diffuse endotheliale Immunreaktion

Innerhalb der ersten 2 Jahre wird ein kontinuierlicher, sich allmählich verlangsamender Endothelzellverlust des Transplantates beobachtet. Bei einem Ausgangsbefund von ca. 2500 Zellen/mm² im Spendergewebe ist der Endothelzellverlust innerhalb der ersten beiden Jahre etwa 15mal gegenüber dem natürlichen Verlauf beschleunigt und verlangsamt sich später erheblich (Patel 2005). Dieser Verlust wird bei unterschiedlicher Konservierungsart und –

dauer des Transplantates beobachtet. Ein potentieller Einfluss nehmender Faktor ist eine mögliche schleichende, endotheliale Immunreaktion (s.u.). Auf der anderen Seite kamen Untersuchungen, die eine Abhängigkeit der HLA (In-) kompatibilität mit dem Ausmaß des Zellverlustes herzustellen versuchten, zu keinem eindeutigen Ergebnis (Reinhard 2004, Ruusuvaara 1979). Es muß jedoch eingeräumt werden, dass eine Vielzahl von möglichen Einflussfaktoren bisher unberücksichtigt blieben bzw. nicht ausreichend bekannt sind. Dazu zählen u.a. unzureichend spezifische oder sensitive HLA-Typisierung oder der Einfluss von Antikörper-vermittelten Immunmechanismen. Völlig unbekannt ist die Bedeutung von sog. „Minorantigenen“, die bei der HLA-Typisierung bisher weitgehend unberücksichtigt bleiben, die sich jedoch in experimentellen Modellen als sehr stark immunogen herausgestellt haben. Untersuchungen zum Vergleich von autologen und homologen Keratoplastiken liefern in diesem Zusammenhang wichtige Hinweise auf die Bedeutung einer chronischen subklinischen Immunreaktion (siehe unten). Klinisch sind die Präzipitate streng auf das Spendergewebe beschränkt (Abbildung 2).

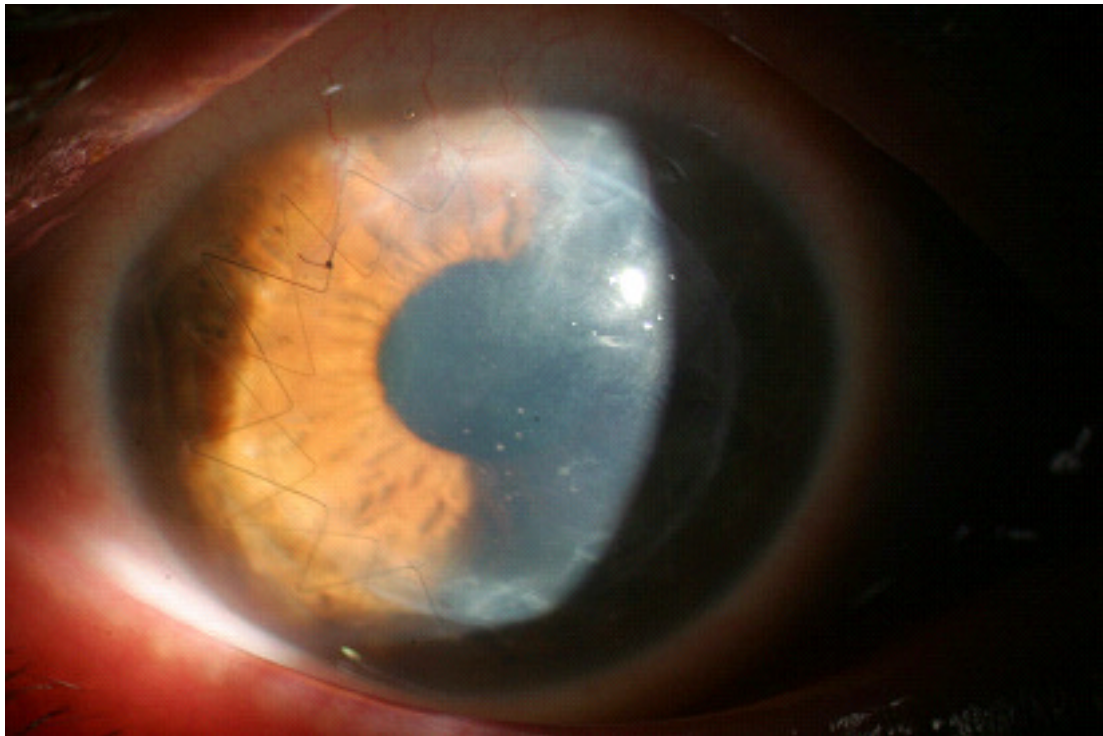


Abbildung 2: beginnende diffuse endotheliale Immunreaktion

Bereits einzelne Präzipitate können zu Endothelzellverlusten mit Stromaödem führen. Abbildung 3 zeigt eine typische Transplantatdekompensation in Folge einer endothelialen Immunreaktion.

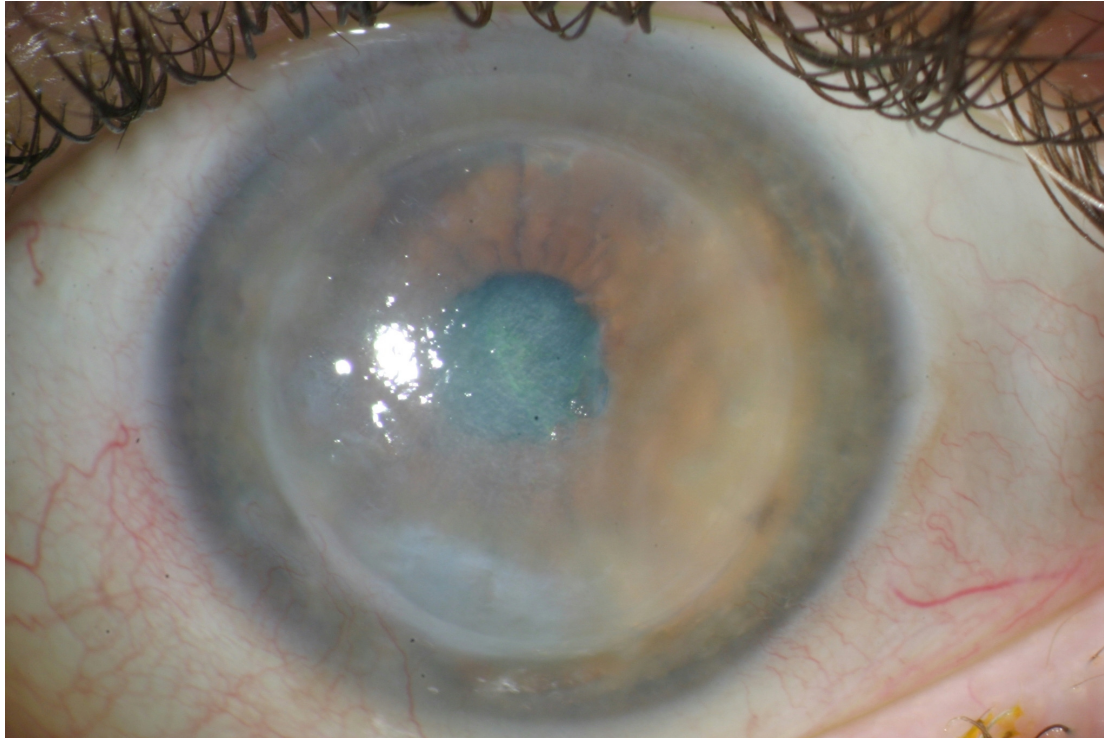


Abbildung 3: Transplantatdekompensation infolge endothelialer Immunreaktion

Diese Reaktionen können als Transplantatschädigung z.T. direkt spiegelmikroskopisch beurteilt werden (Hirst 1983, Musch 1991). Zwar wurde die diffuse Reaktion gegenüber der endothelialen Reaktion mit Khodadoustlinie prognostisch als günstiger eingeschätzt, entscheidend dürfte jedoch der Zeitpunkt der Diagnose, die noch erhaltene Endothelzellreserve und das therapeutische Ansprechen sein.

Über Wechselwirkungen der verschiedenen Reaktionstypen der Abstoßung liegen nur wenige Beobachtungen vor (Allredge 1981, Pleyer 1992). Es ist denkbar, dass eine ablaufende Reaktion mit Freisetzung immunologischer Mediatoren (Zytokine u.a.) eine Reaktion in angrenzenden Strukturen des Transplantates triggern könnte. Als Konsequenz wäre klinisch eine intensiviertere Therapie auch weniger ausgeprägter Reaktionsformen zu ziehen.

Untersuchungen zur Wechselwirkung werden vor allem dadurch erschwert, dass epitheliale und subepitheliale Immunreaktionen häufig für den Patienten unbemerkt ablaufen und nicht zur augenärztlichen Kontrolle führen. Eine Wechselwirkung zwischen oberflächlichen

Reaktionsformen und endothelialen Reaktionen konnte in den bisher vorliegenden Beobachtungen nicht eindeutig belegt werden. Auch bei Unterscheidung in Patienten mit geringem oder erhöhtem Abstoßungsrisiko ergab sich kein signifikant erhöhtes Risiko für endotheliale Reaktionen nach vorangegangener epithelialer oder subepithelialer Immunreaktion (Pleyer 1992). Bei Patienten mit erhöhtem Risiko einer Immunreaktion wurde dagegen nach fokaler, endothelialer Immunreaktion (ohne Khodadoustlinie) häufiger eine darauf folgende, progrediente endotheliale Immunreaktion beobachtet (Pleyer 1992).

1.2. Aktuelle klinische Therapie der Immunreaktion

Die Bedeutung der Therapie der akuten Immunreaktion wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Abstoßungsreaktionen weiterhin die größte Bedrohung für das Transplantatüberleben und den langfristigen Therapieerfolg nach Keratoplastik darstellen (s.o.).

Für die klinische Praxis ist die Prophylaxe der Immunreaktion von großer Relevanz, soweit heute bereits umsetzbar. Dies ist von zunehmender Bedeutung dadurch, dass die Zahl der Risikopatienten, die einer Keratoplastik zugeführt werden, in den letzten Jahren durch Erweiterung der operativen Möglichkeiten, wie z.B. der Limbustransplantation, eher zugenommen hat. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des in dieser Arbeit dargestellten Themas hinsichtlich neuer Ansätze zur Verbesserung der Möglichkeiten der Prophylaxe der Immunreaktion. Ein klinisches Beispiel für eine erfolgreich therapierte Immunreaktion zeigt Abbildung 4. Das Transplantat ist zentral wieder aufgeklärt.

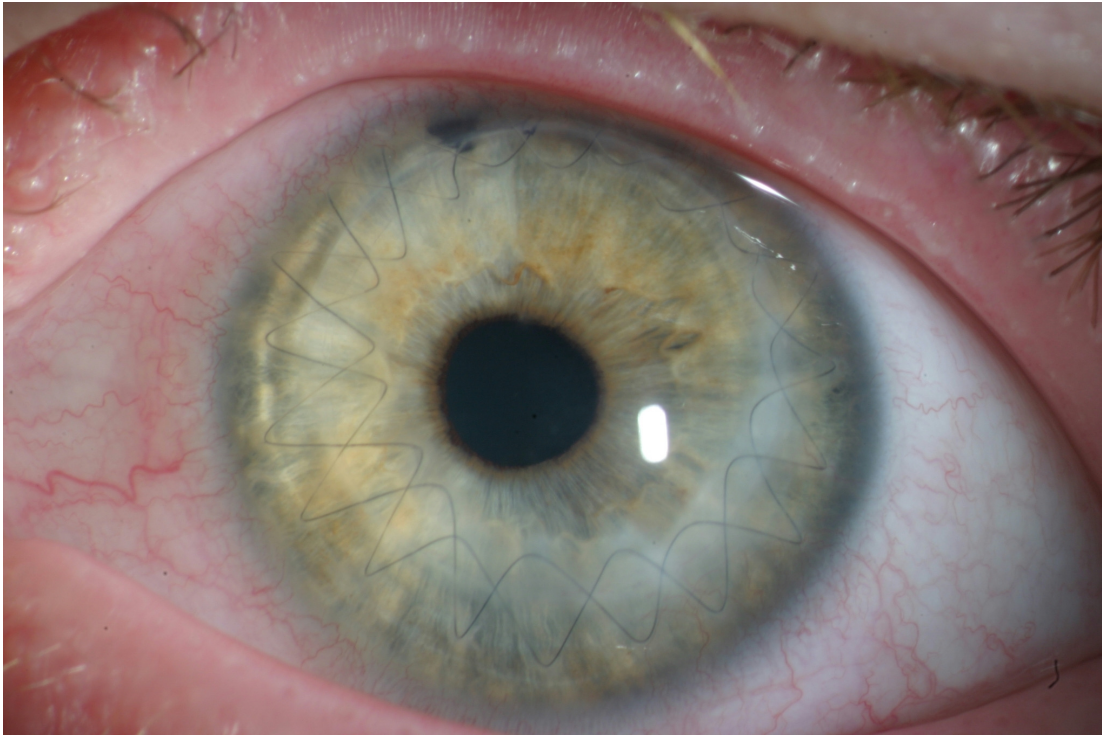


Abbildung 4: wiederaufgeklärtes Transplantat nach therapierter endothelialer Immunreaktion

Bereits in den klinischen Alltag eingezogen ist die Option, neben Cyclosporin A weitere Immunsuppressiva systemisch einzusetzen. Dazu gehören Mycophenolat Mofetil (Reis 1999) oder Tacrolimus (Sloper 2001), die als Cellcept® und Prograf® klinisch zur Verfügung stehen. Darüber hinaus gibt es experimentelle Ergebnisse, die eine Wirksamkeit weiterer Immunsuppressiva, wie z.B. Rapamycin oder „Biologica“, nahelegen. Von besonders aktuellem Interesse sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen zu der Frage, ob auch ein topischer Einsatz dieser Immunsuppressiva möglich ist. Untersuchungen zu diesem Themenkomplex stellen daher einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar (siehe Abschnitt B.). Die meisten bereits abgeschlossenen Untersuchungen gibt es zum Cyclosporin A (Hoffmann 1986). In letzter Zeit wurde auch eine Untersuchung von Tacrolimus abgeschlossen (Reinhard 2005). Eigene Untersuchungen zur Entwicklung von lokalen Präparationen von Mycophenolat Mofetil und Rapamycin sind in Teil B dieser Arbeit ausführlich dargestellt (s.u.).

Daneben hat sich in den letzten Jahren die Untersuchung der Optionen der Genterapie zu einem experimentellen Schwerpunkt im Bereich der Keratoplastik entwickelt. Auf diese

Option wird im dritten Teil dieser Arbeit noch ausführlich eingegangen. Darüber hinaus sind insbesondere die zunehmenden Erkenntnisse im Hinblick auf den Einsatz von HLA-gematchten Transplantaten als Fortschritt im Bereich der “nebenwirkungsfreien“ Prophylaxe der Immunreaktion nach homologer Keratoplastik zu werten (Übersicht in Wachtlin et al. 2003 und Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinische Studien zum HLA-Matching bei der Keratoplastik

Autor/ Land	Patientenzahl	Matching Prioritäten HLA-	Ergebnisse/ Kommentare
Reinhard 2003	398	A, B Dr	Matching HLA-A,-B, -Dr gemeinsam verbessert Prognose
Beekhuis 2003	303	A, B	Matching HLA-A und -B verringert irreversible Immunreaktionen
Khairuddin 2003	459	Dr	HLA-A, -B –Dr Matching verringert Immunreaktionsrate bei Normal- und Hochrisiko-KPL
Bartels 2001	64	Dr	Bei Hochrisiko-KPL günstiger Einfluß von HLA-A + -Dr- Matching

Völcker-Dieben 2000	1681	A, B, Dr	Signifikanter Nutzen von HLA- A,B und Dr-Übereinstimmung
Munkhbat 1999	79	A, B (1 bis 4 Allele)	Signifikant höheres abstoßungsfreies Transplantatüberleben im Vergleich zu Empfängern ohne Matching
Hill 1997	115	A, B ,Dr	HLA-A + Dr-Match reduziert, HLA-B Match erhöht Abstoßungsrisiko-
Fink (CCTS) 1994	37	A, B, Dr	Kein Nutzen bei Hochrisiko-KPL
Bradley (CTFS) 1993	542	A, B, Dr	HLA-A +-B Match reduziert, HLA-Dr Match erhöht Abstoßungsrisiko
Baggesen 1991	51	Dr	Dr-Match verbessert Transplantatüberleben
Baumgartner 1988	62	A, B	HLA-B Match wichtiger als -A-Match
Boisjoly 1986	348	A, B, Dr	Bei gutem Match:91%; bei schlechtem Match 78 % abstoßungsfrei

Für die widersprüchlichen Ergebnisse der älteren Studien (kein Vorteil des Matching, sogar Nachteil des Matching) haben sich in den letzten Jahren eine Reihe von Erklärungen

abgezeichnet. Dazu gehören die Wahl der Bewertungskriterien (Transplantatdekompensation ist nicht gleich Z.n. Immunreaktion), teilweise fehlerhafte Bestimmung der HLA-Typen mit älteren Analysemethoden in den Studien sowie die Bedeutung der Minor-Antigene (s.o.).

Im Gegensatz zu diesen Bemühungen zur Prophylaxe der Immunreaktion in Hochrisikosituationen basiert die Therapie der akuten Abstoßungsreaktion im wesentlichen auf herkömmlichen Therapieformen. Die lokalen und systemischen Steroide stehen in der klinischen Praxis weiterhin noch im Mittelpunkt der Behandlung. Aufgrund der geringen Zahl von evidenzbasierten klinischen Studienergebnissen ist die eindeutige Überlegenheit einer Strategie nicht anzugeben und konkrete Handlungsrichtlinien können daher nur sehr begrenzt aus kontrollierten klinischen Studien abgeleitet werden.

Epitheliale und subepitheliale Immunreaktionen, als für das Transplantatüberleben weniger bedrohliche Ereignisse, werden überwiegend mit topischen Steroiden behandelt. Die intensiviertere topische Steroidtherapie in diesen Fällen ist gerechtfertigt, da die Triggerung einer gefährlichen endothelialen Abstoßung in diesen Situationen nicht auszuschließen ist (Allredge 1981). Der Nutzen dieser Therapie muss abgewogen werden gegen das Risiko einer „Überbehandlung“ von nicht immunologischen Oberflächenproblemen, die beispielweise als wirbelförmige Epitheliopathie bei Benetzungstörungen der Oberfläche und insbesondere während des Epithelzellaustausches Spender-Empfänger auftreten können. Die Oberflächenregeneration selbst wird durch die Steroidtherapie eher behindert. Eine intensiviertere Therapie mit Tränenersatzmitteln muß in jedem Fall zusätzlich erfolgen. Als problematisch ist in diesem Zusammenhang deutlich anzuführen, dass die Tränenersatztherapie nach Keratoplastik nicht zum Leistungskatalog der deutschen gesetzlichen Krankenkassen gehört.

Von Bedeutung für die Therapie der akuten endothelialen Immunreaktion sind vor allem die Studien von Hill et al. aus den Jahren 1991 und 1994 (Hill 1991, Hill 1994). Von diesen Autoren wurde die Anwendung einer intravenösen Prednisolon-Pulstherapie (500mg i.v.) zur Behandlung der akuten endothelialen Immunreaktion empfohlen. Bei Einsetzen der Therapie innerhalb der ersten 8 Tagen nach Beginn der Symptome war diese Applikationsform der oralen Prednisolontherapie überlegen. Die wiederholte Anwendung der Pulstherapie hatte dabei keinen Vorteil gegenüber der einmaligen Gabe. In einer kontrollierten Studie von Hudde aus dem Jahre 1999 hatte die Pulstherapie allerdings gegenüber der intensivierten

topischen Therapie mit Dexamethason 0,1 %, ergänzt durch einmalige subkonjunktivale Betamethasoninjektion, keinen Vorteil (Hudde 1999), so dass –wie schon angeführt– die Ergebnisse der kontrollierten Studien allein keine ausreichende Handlungsrichtlinie für die Praxis liefern können. Im Jahr 2002 wurde darüber hinaus die Option, Steroide auch intracameral zu applizieren, im Rahmen einer Pilotstudie an 28 Patienten untersucht. Das Ansprechen auf die Therapie zeigte sich in dieser Studie als günstig, da es sich allerdings um eine unkontrollierte Studie handelte, sind die Ergebnisse noch als vorläufig zu werten (Reinhard 2002).

Die sehr variable Vorgehensweise spiegelt sich auch in den Ergebnissen zur klinischen Praxis wider. In einer Umfrage unter deutschsprachigen Ophthalmologen gaben 95 % der Befragten an, bei der akuten fokalen endothelialen Immunreaktion intensiviert mit topischen Steroiden (z.B. stündlich) zu behandeln (Bertelmann 2003). Nahezu die Hälfte (48 %) antworteten, zusätzlich mit oralen Steroiden zu therapieren, und 42 % gaben Steroide intravenös. Von fast einem Drittel (29%) der Befragten wurden Steroide subkonjunktival appliziert. In ähnlichen Umfragen unter amerikanischen (Rinne 1992) und britischen (Koay 2005) Transplantateuren, die mit einem Abstand von 10 Jahren durchgeführt wurden, ergab sich bezüglich des Einsatzes von topischen Steroiden bei der akuten endothelialen Immunreaktion ein identisches Bild. Topische Steroide wurden zu je 100 % eingesetzt. Subkonjunktivale Steroide wurden in der (früheren) amerikanischen Umfrage deutlich häufiger verwendet (etwa 50 % versus etwa 15 % in der neueren Erhebung). Immerhin gaben 6 % der britischen Kollegen an, bei der akuten endothelialen Immunreaktion auch mit anderen Immunsuppressiva zu behandeln. In unserer Befragung antworteten 12 %, bei der akuten endothelialen Immunreaktion mit topischem Cyclosporin A zu behandeln. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse ist der Nutzen von topischem Cyclosporin bei der akuten Immunreaktion umstritten, worauf in Teil B dieser Arbeit noch näher eingegangen wird. Gründe liegen in der bekannterweise schlechten intraokularen Bioverfügbarkeit des herkömmlichen, als ölige Präparation hergestellten lokalen CsA-Präparats und darin, dass eine systemische Wirkung auch des lokal applizierten Wirkstoffs durch Aufnahme in die Zirkulation nicht ausgeschlossen werden kann. In mehreren Studien wurde CsA darüber hinaus zusätzlich zu Steroiden gegeben, so daß die Wirkungen der Einzelsubstanzen schwer abgrenzbar sind. In experimentellen Untersuchungen von Hoffmann und Zhang am Mausmodell zeigte sich keine Wirksamkeit von lokalem und von systemischem CsA bei der Immunreaktion (Hoffmann 1986, Zhang 2000).

Problematisch kann die Therapie einer Immunreaktion bei Keratoplastik nach Herpes-Keratitis sein, wenn differenzialdiagnostische Schwierigkeiten bei der Abgrenzung einer Abstoßung von einem Herpes-Rezidiv auftreten (s.o.). Die Wirksamkeit von oralem Acyclovir (2 x 400 mg) zur Prophylaxe von Herpes-Rezidiven auf dem Transplantat ist in mehreren Studien, zuletzt 2003 von van Rooij et al. (van Rooij 1993), gezeigt worden. Andererseits ist eine Virusreaktivierung auch durch die systemische Steroidtherapie im Zuge einer Immunreaktion möglich. Eine klare Differenzierung ist wünschenswert, um eine zielgerichtete Therapie einzuleiten, und z.B. durch Virusnachweis (PCR) oder Virusantikörpernachweis möglich (Robert 2005). Im Zweifelsfall sollte bei einer endothelialen Immunreaktion mit bekannter Anamnese der Herpes-Keratitis in jedem Fall zusätzlich mit systemischem Acyclovir mindestens 2 x 400 mg oral behandelt werden, wenn die Immunreaktion zu einem Zeitpunkt auftritt, zu dem ein Herpes-Rezidiv entsprechend der Reinnervation des Transplantats möglich ist. Wenn tatsächlich ein akutes Rezidiv einer Herpes-Keratouveitis vorliegt, ist diese Dosierung allerdings zu niedrig, in diesem Fall muss mit 5 x 400 mg bis zur Maximaldosis von 5 x 800 mg / Tag therapiert werden. Auch bei nicht sicherer Abgrenzung eines Herpes-Rezidivs von einer epithelialen Immunreaktion sollte im Zweifelsfall lieber zusätzlich mit oralem Acyclovir therapiert werden.

Eine abschließende Antwort bzgl. einer überlegenen Therapiestrategie der akuten endothelialen Immunreaktion kann derzeit nicht gegeben werden. Aufgrund der Konsequenzen des erfolglos therapierten Ereignisses (Transplantatdekompensation, Erblindung) erscheint ein „aggressiveres“ Vorgehen aber gerechtfertigt, was die stationäre Behandlung sowie die systemische Gabe von Steroiden einschließt. Eine Berücksichtigung der individuellen Situation des Patienten (Compliance, Anreiseweg, Ultimussituation) ist aber bei der Entscheidung für die im Einzelfall richtige Therapie sicherlich zu berücksichtigen. Zusammenfassend ausgedrückt liegt die Chance zur Beherrschung der akuten endothelialen Immunreaktion zur Zeit im wesentlichen im rechtzeitigen Erkennen der Symptome und im schnellstmöglichen Einleiten der verfügbaren (begrenzten) therapeutischen Möglichkeiten. Optionen für zukünftige Therapieformen liegen vor allem in der weiteren Verbesserung der Möglichkeiten der Prophylaxe der Immunreaktion (siehe Teil B und C).

2. Eigene Untersuchungen der Risikofaktoren des Endothelzellverlustes

2.1. Risikofaktoren für chronischen Endothelzellverlust nach homologer Keratoplastik

2.1.1. Einführung

Die hohe Rate des postoperativen Endothelzellverlustes stellt ein ungelöstes Problem nach homologer perforierender Keratoplastik dar (Bourne 1978, Bourne 1983, Bourne 1997, Ing 1998). Die Ursachen dieses Phänomens sind bisher ungenügend verstanden.

Beitragende Faktoren sind chirurgisches Trauma, Zellaustausch zwischen Spender und Empfänger (Wollensak 1999), Zellalterung, akute Immunreaktionen (Musch 1991) und chronische subklinische Immunreaktionen (siehe unten). Eine Reihe weiterer

Risikofaktoren sind in vorausgegangenen Studien bereits identifiziert worden. Einige dieser Ergebnisse sind allerdings bisher noch widersprüchlich. Während Maguire et al (1994) und Reinhard et al. (2001) das Glaukom als wahrscheinlichen Risikofaktor identifiziert haben, fanden Nguyen und Mitarbeiter 2002 zu keinem postoperativen Zeitpunkt eine Korrelation zwischen dem intraokularen Druck und der mittleren Endothelzellichte des Transplantats.

Diese unklare Situation war der Anlass, eine eigene Untersuchung bezüglich der Risikofaktoren des chronischen Endothelzellverlustes durchzuführen. In der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchung wurden die Endothelverlustraten von 293 Patienten, die zwischen 1996 und 2000 in der Augenklinik der Charité Campus Virchow Klinikum hornhauttransplantiert wurden, ausgewertet. Einbezogene Indikationen umfassten Keratokonus, bullöse Keratopathie, Fuchs'sche Endotheldystrophie, Stromanarben, Herpes Keratitis, Keratoplastik à chaud sowie Re-Keratoplastik.

2.1.2. Material und Methoden

Einbezogen in diese Untersuchung wurden die Daten von 293 Keratoplastik-Patienten, 160 Frauen (54,6 %) und 133 Männer (45,4 %), die von 1996 bis 2000 an der Augenklinik der Charité Campus Virchow Klinikum operiert wurden.

Die Endothelzellichte der Spender wurde präoperativ am enukleierten Bulbus mittels Non-contact-Spekularmikroskopie (NonCon Robo, Konan, Nishinomiya, Hyogo, Japan) bestimmt. Es wurde eine zentrale Messung sowie je ein Bild in jedem Quadranten erhoben. Die mittlere Post-mortem-Zeit bei der Endothelzellmessung betrug 4 Stunden. Die Spender-Trepangröße reichte von 7,0 Millimeter bis zu 8,5 Millimeter mit einem

mittleren Durchmesser von 7,64 Millimetern. Die Trepanation wurde mit dem Barron Trepanssystem durchgeführt. Doppelt fortlaufende Sternnähte wurden bei allen Patienten benutzt (Nylon 10-0 und 11-0). Healon beziehungsweise Healon 5 (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) wurde vor der Trepanation in die Vorderkammer injiziert und am Ende der Operation vollständig entfernt. Die postoperative Behandlung bestand aus topischen Steroiden (1%-Prednisolon-Acetat-Suspension) fünf mal täglich für 2 Wochen, 3 mal täglich für 3 Monate und einmal täglich für 1 Jahr. Zusätzlich erhielten die Patienten lokale Gleitmittel 12mal/Tag für mindestens 6 Monate. Zur Vermeidung früher postoperativer Druckanstiege erhielten alle Patienten systemische Karboanhydrasehemmer am Tag der Operation (500 mg i.v.). Glaukumpatienten erhielten zusätzliche antiglaukomatöse Medikation. Präoperativ war der Augendruck bei allen Patienten so gut wie möglich reguliert. Postoperative Kontrolluntersuchungen wurden zwei Wochen, vier Wochen, drei Monate und sechs Monate nach der Operation und dann alle 6 Monate bis zum Ende des Follow-up durchgeführt. Sehschärfe, Astigmatismus, Vorderabschnittsbefund, intraokularer Druck und Fundusbefund wurden bei jeder Kontrolle geprüft. Der intraokulare Druck wurde mittels Applanationstonometrie bestimmt. Die Endothelzelldicke wurde mittels Non-contact Spekularmikroskopie erhoben. Wegen der temporären postoperativen Schwellung des Transplantats konnten die ersten postoperativen Bestimmungen der Endothelzelldicke erst nach 3 bis 6 Monaten durchgeführt werden. Indikationen für die homologen Keratoplastiken umfassten bullöse Keratopathie, Fuchs'sche Endotheldystrophie, Keratokonus, Stromanarben, Stromadystrophien und Herpes-Keratitis, Keratoplastik à chaud und Re-Keratoplastik. Die Verteilung dieser Indikationen im Patientenkollektiv der Klinik und die Zahl der Patienten mit Glaukom werden in Abbildung 5 gezeigt.

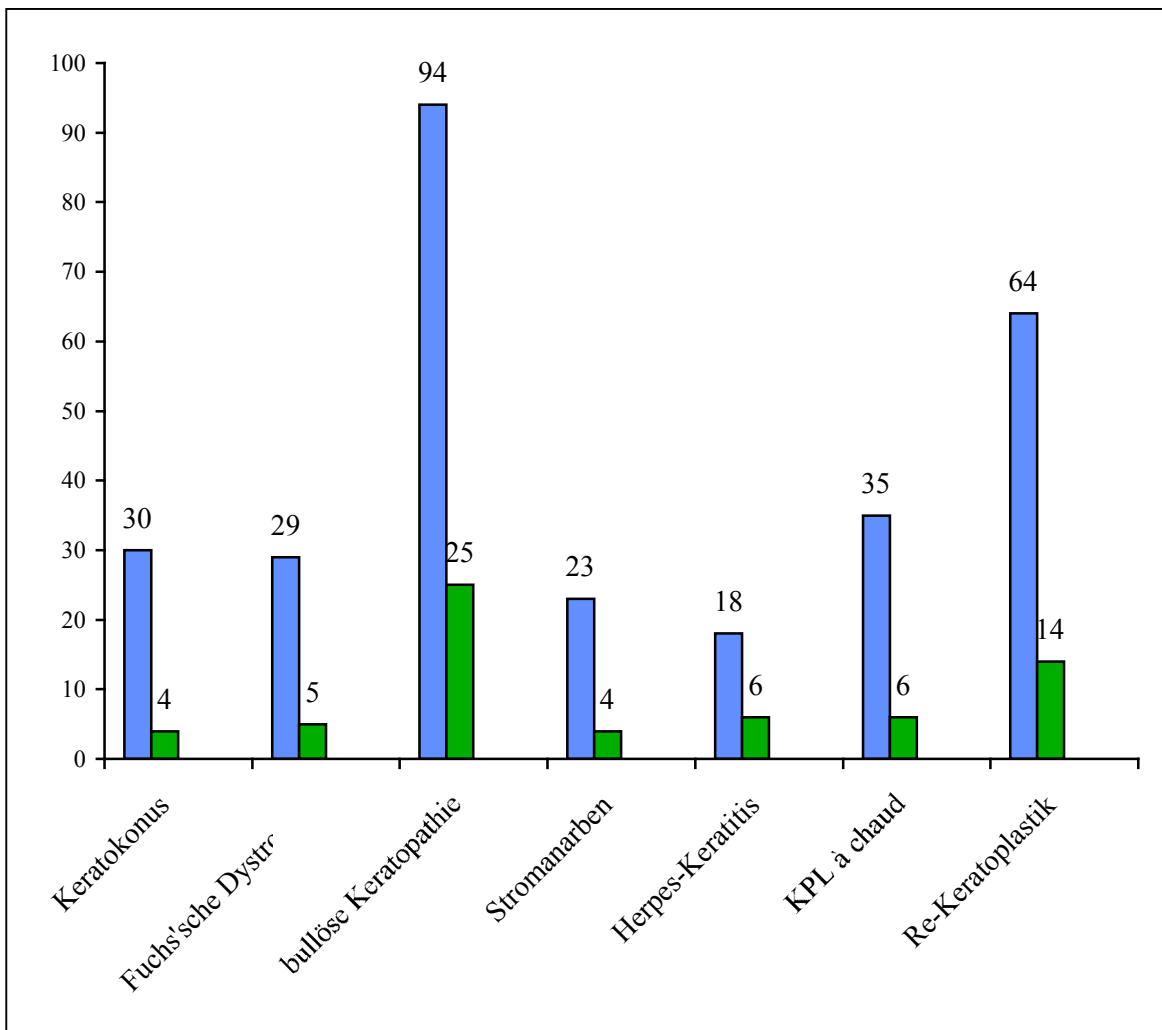


Abbildung 5: Verteilung der Indikationen bei dem untersuchten Patientenkollektiv (n = 293, Gruppe mit Glaukom: n= 64 (22 %))

(blaue Säule: Patienten insgesamt, grüne Säule: Patienten mit Glaukom)

Die Transplantate, die für die homologen Keratoplastiken verwendet wurden, stammten aus der Hornhautbank Berlin und waren dort nach den Richtlinien der „European Eye Bank Association“ (EEBA) kultiviert worden. Als Kulturmedium wurde MEM-(Minimal essential medium)-Earle's (Biochrom, Berlin Germany) + 2 % fetales Kälberserum (FCS)(Gibco, Paisley, Scotland, UK) verwendet. Die mittlere Kulturzeit betrug 13 Tage. Unterschiede bezüglich des endothelialen Zellverlustes zwischen den Transplantaten nach 6, 12, 24 und 6 Monaten wurden statistisch mit dem ungepaarten t-Test ausgewertet. Prä- und postoperativer Visus wurde statistisch mit dem Wilcoxon-Test verglichen.

2.1.3. Ergebnisse

Die Sehschärfe stieg um 7 Zeilen (36 Monate postoperativ im Vergleich zum präoperativen Wert). Der Anstieg war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Der beste postoperative Visus lag bei 1,0, der schlechteste betrug Handbewegungen. Bei Keratokonuspatienten lag der mittlere Visusanstieg bei 8 Zeilen, während in Hochrisikosituationen im Mittel nur 3 Zeilen Visusanstieg erreicht wurden. Der mittlere keratometrische Astigmatismus betrug 4,7 Dioptrien vor der Fadenentfernung und 4,4 Dioptrien nach der Entfernung aller Fäden. Die Fadenentfernung wurde 1 Jahr postoperativ durchgeführt, wenn der Astigmatismus zu diesem Zeitpunkt über 4 Dioptrien lag.

Die mittlere Endothelzelldichte des Spenders lag bei 2434 Zellen / mm^2 (2000 – 3115 Zellen / mm^2). Eine untere Grenze von 2000 Zellen / mm^2 wurde aus Gründen der Qualitätskontrolle festgelegt in dem Sinne, dass kultivierte Hornhäute mit einer geringeren Zelldichte als 2000 Zellen / mm^2 von der Transplantation ausgeschlossen wurden. Im Vergleich zur präoperativen Spenderzelldichte lag der mittlere Endothelzellverlust nach 6 Monaten bei 28,8 %, nach 12 Monaten bei 39,8, bei 49 % nach 24 Monaten und bei 54 % nach 36 Monaten (Abbildung 6).

Patienten mit Keratokonus hatten einen geringeren Zellverlust als Patienten mit Fuchs'scher Dystrophie und Herpes-Keratitis (Abbildung 7). Aufgrund der hohen Streuung der Werte war dieser Unterschied aber nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Spenderalter und initiale Zellzahl hatten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Endothelzellverlustrate (Abbildung 8). Dagegen hatten Patienten mit der Nebendiagnose Glaukom (64 Patienten (22 %)) einen auffällig höheren Zellverlust von 55 % nach 6 Monaten, 59 % nach 12 Monaten, 62 % nach 24 Monaten und 65 % nach 36 Monaten. Diese Unterschiede waren gegenüber dem mittleren Zellverlust der Gesamtgruppe im t-Test signifikant zu allen Zeitpunkten bis zu 24 Monaten (Abbildung 9).

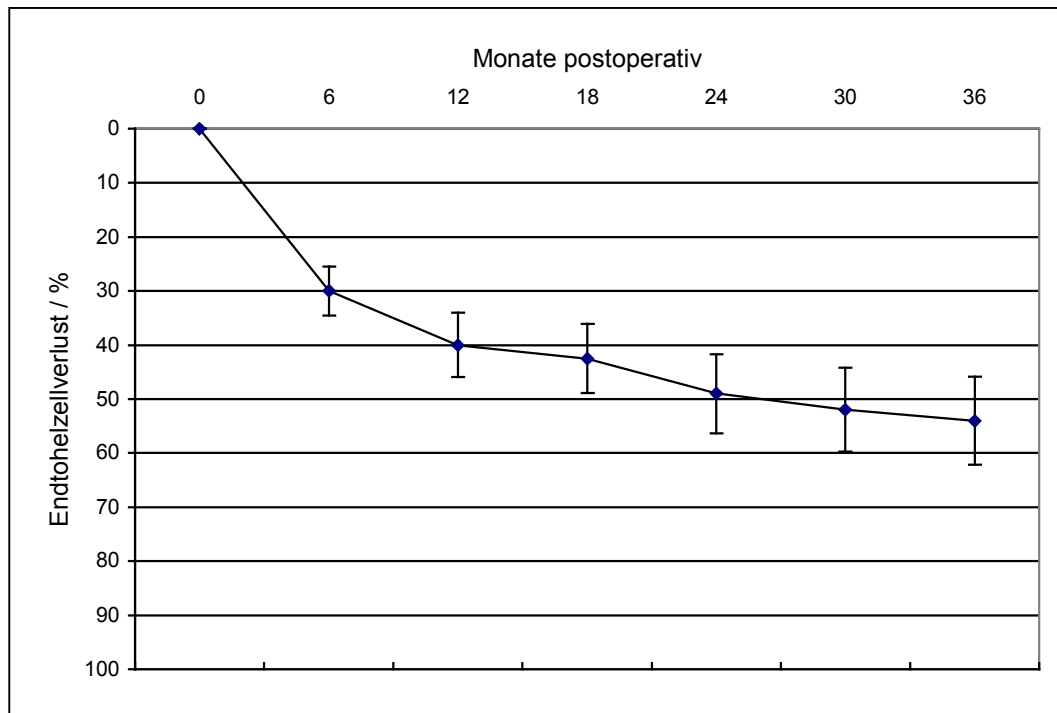


Abbildung 6: Endothelverlust bei unserem Patientenkollektiv über 36 Monate

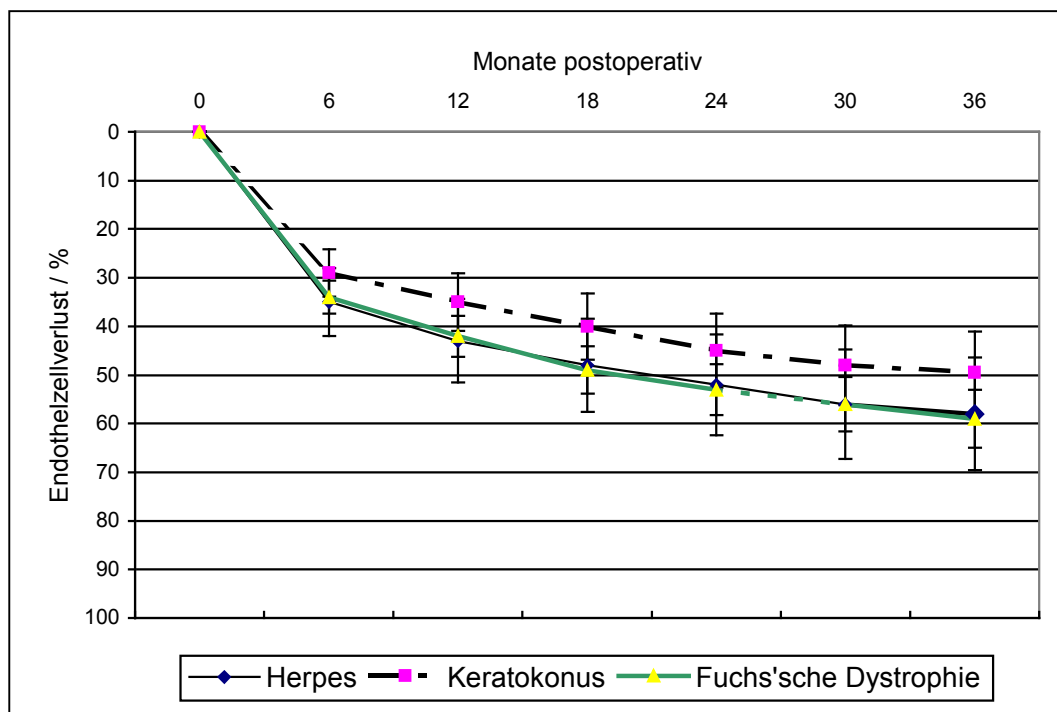


Abbildung 7: Vergleich des Endothelverlustes von Patienten mit Keratokonus, Fuchs'scher Dystrophie und Herpes-Keratitis

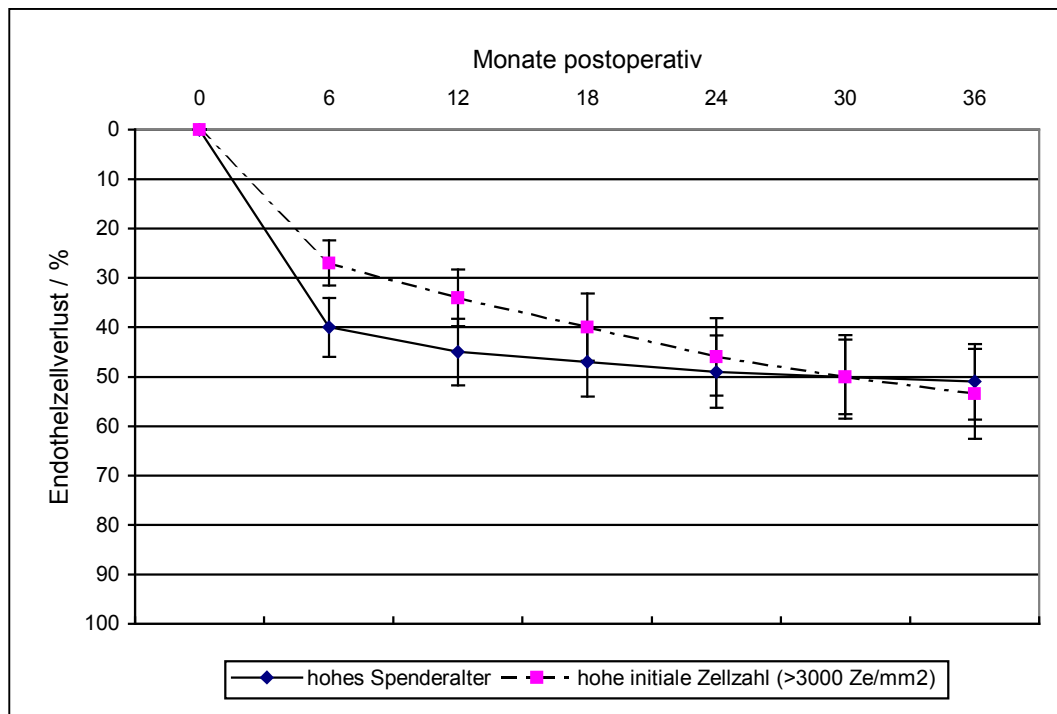


Abbildung 8: Endothelzellverlust in Abhängigkeit von spenderabhängigen Faktoren

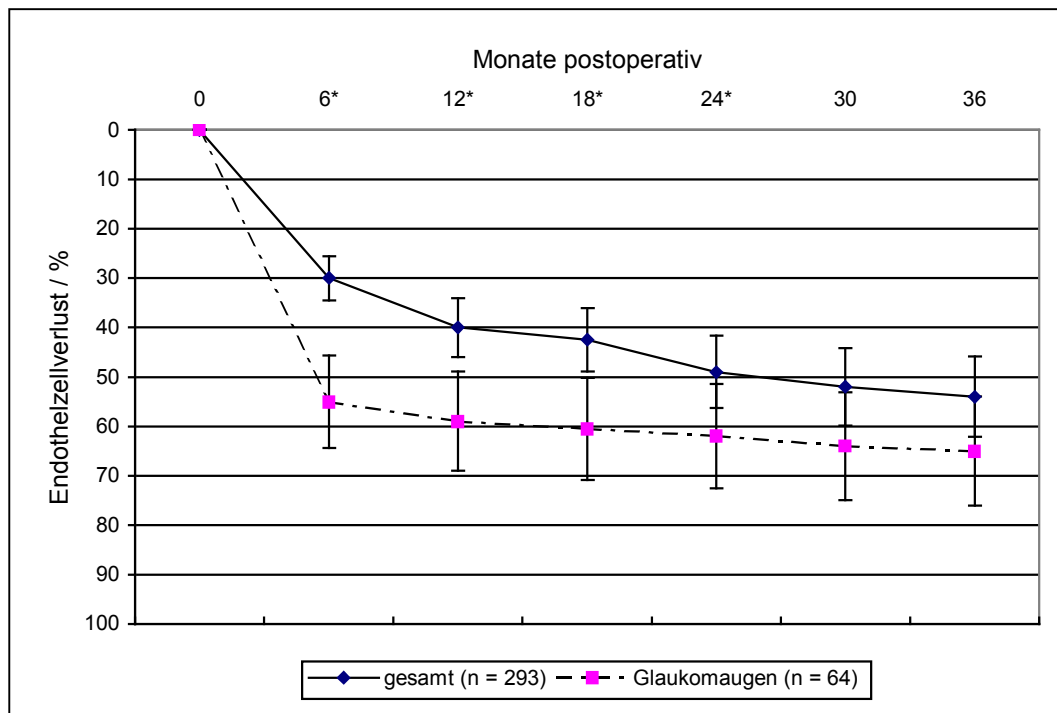


Abbildung 9: Endothelzellverlust bei Glaukom

2.1.4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Verlauf der Endothelzellichte nach homologer Keratoplastik in Relation zu Spender- und Empfänger-abhängigen Faktoren untersucht. Wir fanden, dass die Diagnose des Glaukoms mit einem erheblich erhöhten Verlust der Spender-Endothelzellen nach Keratoplastik verbunden ist, verglichen mit dem mittleren Endothelverlust einer Gruppe von 293 Patienten. Dieses Ergebnis ist von Interesse, weil die Aussagen vorhergehender Studien widersprüchlich waren. Während einige Studien einen Einfluss des erhöhten intraokularen Drucks auf die endotheliale Zellverlustrate (Maguire 1994, Reinhard 2001) demonstriert haben, fanden Nguyen und Mitarbeiter 2001 keine Abhängigkeit zwischen postoperativem intraokularem Druck und dem Endothelzellverlauf (Nguyen 2002). Ein wichtiger Faktor, der zur Erklärung des Widerspruchs beiträgt, ist das Problem der korrekten Messung des intraokularen Drucks nach Keratoplastik. Die einzige, klinisch etablierte Methode zur exakten Bestimmung des intraokularen Drucks ist die intraokulare Messung durch Vorderkammerpunktion. Alle weiteren Methoden (Impressionstonometrie, Applanationstonometrie – wie in der Studie von Nguyen- und Non-contact-Tonometrie) führen zu einer bekannten hohen Rate falscher Messungen. Besonders die Applanationstonometrie hängt in einem hohen Umfang von der Hornhautdicke ab, ein Faktor, der bei transplantierten Hornhäuten in hohem Maße schwankt. Andererseits sind Hornhautpachymetrien in dieser Studie nicht durchgeführt worden.

Eine überzeugende Erklärung für eine Intraokulardruck-abhängige Endothelzellschädigung, die auf Zellbiologie basiert, existiert bisher nicht. Eine hypothetische Erklärung könnte die Druck-abhängige Induktion von Apoptose in den kornealen Endothelzellen sein. Jedoch haben unterschiedliche experimentelle und klinische Studien eine Relation erhöhten Intraokulardrucks und des endothelialen Zellenverlustes sogar in normalen, gesunden Hornhäuten gezeigt (Gagnon 1997, Ollivier 2003). Ollivier und Mitarbeiter zeigten 2003 eine zeitabhängige signifikante Abnahme der Endothelzellichte in einem Rhesusaffen-Modell für okuläre Hypertension. Gagnon untersuchte 1997 102 Glaukompatienten und fand bei diesen eine signifikant niedrigere Endothelzellichte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von 52 Patienten mit normalem Augendruck. Jedoch konnte eine (zusätzliche) endotheliale Zellschädigung durch die topische Glaukommedikationen in dieser Studie nicht ganz ausgeschlossen werden. Ein kritischer Punkt in unserer Studie ist, dass der Intraokulardruck mittels

Applanationstonometrie bestimmt wurde (als das etablierte klinische Verfahren in unserer Klinik trotz der Beschränkungen dieser Methode in bezug auf die Hornhautpathologie). Unserer Meinung nach unterstützen die Ergebnisse unserer Studie die Zweifel, die mit der Anwendung der Applanationstonometrie bei Keratoplastik-Patienten verbunden sind. Die Resultate unserer Studie lassen es möglich erscheinen, dass der Intraokulardruck bei unseren Glaukompatienten –die alle einen präoperativ (scheinbar) regulierten Druck hatten- tatsächlich höher als mittels Applanation gemessen war. Kürzlich zeigten Borderie et al., dass eine erhöhte Transplantatdicke ein prädiktiver Faktor für ein Transplantatversagen ist (Borderie 2005). Zuvor konnten Seitz und Mitarbeiter nachweisen, dass sich die Abnahme der Endothelzelldicke umgekehrt proportional zur Zunahme der Transplantatdicke (Seitz 2001) verhält. Eine erhöhte Transplantatdicke führt zu Überschätzung des Intraokulardrucks in der Applanationstonometrie, so dass die falsch niedrigen Druckwerte mit zunehmendem postoperativem Verlauf seltener werden müssten. Diese Hypothese sollte durch eine Untersuchung zum Vergleich von applanatorisch und intraokular erhobenen Druckwerten nach Keratoplastik überprüft werden. In der klinischen Praxis sollten (exakte) intraokular bestimmte Tensiwerte nach unserer Ansicht häufiger erhoben werden, zumindest bei Keratoplastik-Patienten mit bereits zuvor bekannten Problemen der Druckregulation.

Außer dem erhöhtem intraokularem Druck sind andere mögliche beeinflussende Faktoren auf den chronischen endothelialen Zellverlust unter Diskussion. Der erste Faktor, der manchmal beschuldigt wird, zusätzlichen Endothelzellverlust zu erzeugen, ist die Methode der Organkultivierung (Bourne 1984). Jedoch zeigte eine frühere Studie, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der postoperativen Endothelzellverlustrate zwischen Hornhäuten, die in Gewebekulturmedium bei 4 °C (z.B. Optisol) gelagert werden -der am häufigsten verwendeten Aufbewahrungstechnik in den Vereinigten Staaten- und organkultivierten Hornhäuten bis zu zwei Jahren postoperativ (Frueh und Boehnke 2000) gibt.

Die Bedeutung einer chronischen subklinischen Immunreaktion wird im folgenden Abschnitt näher beleuchtet. Aufschlussreich in dieser Frage ist der Vergleich von autologen und homologen Transplantaten (siehe unten).

Zusätzlich scheint die Zellmigration zwischen Spender und Empfänger die endotheliale Zellverlustrate (Reinhard 2002) zu beeinflussen. Dieses Phänomen erklärt eine höhere Rate an Endothelzellverlust bei Patienten mit bullöser Keratopathie im Vergleich zu

Keratokonius-Patienten, die ein gesundes Endothel mit normaler Zelldichte in der peripheren Empfängerhornhaut haben (Langenbacher 2002). Obwohl in unserer Studie der Zellverlust bei Keratokonius-Patienten niedriger als bei Patienten mit Fuchs'scher endothelialer Dystrophie, die wie Patienten mit bullöser Keratopathie ein reduziertes alteriertes peripheres Endothel in der Empfängerhornhaut haben, war, waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Andere Autoren fanden ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des endothelialen Zellverlustes zwischen Keratokonius- und Fuchs'schen Dystrophie-Patienten (Seitz 2001).

Eine hohe Ausgangszelldichte der Spenderhornhaut ist mit einer höheren endothelialen Zellverlustrate nach einem Jahr korreliert worden (Musch 1993). In unserer vorliegenden Untersuchung konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Unserer Meinung nach liegt auch eine überzeugende theoretische Erklärung für eine solche Wechselbeziehung nicht vor. Außerdem scheint die Verwendung von Transplantaten junger Spender in unserer Studie keinen schützenden Effekt auf den Endothelzellverlust des Empfängers zu haben. Andere Autoren hatten vorgeschlagen, Transplantationen von älteren Spendern zu vermeiden, um diesen Verlust zu verringern (Musch 1993, Böhringer 2002). Eine solche Selektivität hat nach unserer Meinung daher wenig Nutzen.

Abschließend soll die Frage diskutiert werden, welche Möglichkeiten dem Chirurgen klinisch zur Verminderung der hohen Rate des Endothelzellverlustes nach homologer Keratoplastik zur Verfügung stehen. Die Verwendung von verhältnismäßig kleinen Transplantaten sollte den Beitrag einer chronischen Immunreaktion verringern.

Andererseits liefert in Situationen von defektem Empfängerendothel ein verhältnismäßig großes Transplantat eine größere Reserve an gesunden Spenderendothelzellen und liefert folglich einen besseren Schutz für das zentrale Transplantat. Die Resultate unserer Studie erlauben die Schlussfolgerung, dass das konsequente und ausreichende Senken des intraokularen Drucks vermutlich das vielversprechendste Mittel ist, um eine Reduktion des chronischen Endothelzellverlustes zu erzielen. In diesem Kontext soll noch einmal betont werden, dass der chronische Endothelverlust der wichtigste Grund für die späte Transplantatdekompensation nach homologer Keratoplastik ist (Nishimura 1999, Patel 2005).

2.2. Vergleich autologe – homologe Keratoplastik: Bedeutung der chronischen subklinischen Immunreaktion

2.2.1. Einführung

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten dargestellt, ist die Natur des schleichenden Endothelzellverlustes nach der Keratoplastik bis heute nur unvollständig verstanden. Von den in Frage kommenden beeinflussenden Faktoren –wie erwähnt: chirurgisches Trauma, Zellaustausch zwischen Spender und Empfänger (Wollensak 1999), Zellalterung, akute Immunreaktionen (Musch 1991) und chronische subklinische Immunreaktion (Bell 2000) lässt sich die Immunreaktion bei einer Sonderform der Keratoplastik, der autologen Keratoplastik, ausschließen, da körpereigenes Gewebe transplantiert wird.

Untersuchungen an diesem Patientenkollektiv lassen daher Rückschlüsse auf den Einfluss der chronischen Immunreaktion auf den Endothelverlust zu. In diesem Zusammenhang wurde die hier dargestellte, offene, prospektive Studie durchgeführt, in der der Endothelzellverlauf bei Patienten nach autologer Rotationskeratoplastik erfasst und mit einer Kontrollgruppe von homologen Keratoplastiken verglichen wurde.

Die autologe Keratoplastik ist schon recht früh in der Geschichte der Keratoplastik erstmals beschrieben worden (Kraupa 1914). Sie ist prinzipiell in 3 Formen möglich, die auch jeweils in unterschiedlichem Ausmaß klinisch umgesetzt wurden:

1. Autologe bilaterale Keratoplastik: das Transplantat wird vom blinden Auge der Gegenseite gewonnen und beide Hornhäute werden ausgetauscht.
2. Ipsilaterale autologe Keratoplastik: zwei "Mini"- Transplantate (ein zentrales und ein peripheres) aus derselben Hornhaut werden gegeneinander ausgetauscht.
3. Autologe ipsilaterale Rotationskeratoplastik: durch exzentrische Trepanation wird eine zentrale Trübung in die Peripherie und die klare periphere Hornhaut ins optische Zentrum transponiert (gedreht).

Insbesondere die beiden ersten Modifikationen haben äußerst begrenzte klinische Einsatzmöglichkeiten. Für die bilaterale autologe Keratoplastik muss ein blindes Auge mit einer gesunden Hornhaut auf der Gegenseite vorhanden sein. Außerdem muss die trübe Hornhaut noch transplantierbar sein, so dass beispielsweise eine Hornhaut mit bullöser Keratopathie und schmerzhaften Epithelaufbrüchen ausgeschlossen werden muss. Die ipsilaterale Keratoplastik mit zwei Mini-Transplantaten erfordert eine sehr kleine umschriebene zentrale Trübung bei in der Peripherie gesunder Hornhaut. Darüber hinaus

beeinträchtigen die zentral liegenden Nähte das visuelle Ergebnis durch Induktion von Astigmatismus und subepithelialer Fibrose.

Die Erstbeschreibung der ipsilateralen autologen Rotationskeratoplastik erfolgte bereits im Jahr 1914. In diesem Jahr erschien im „Zentralblatt für Augenheilkunde“ ein Artikel von Kraupa mit dem Titel: “Transposition durch Lappendrehung: eine neue Methode der Keratoplastik“. Seitdem wurden verschiedene Modifikationen dieser Technik vorgeschlagen, beispielsweise die Rotation eines 8-förmigen Transplantats (Vasco-Posada 1967). Seither ist die Rotationskeratoplastik meist als (schlechterer) Ersatz für die homologe Keratoplastik angesehen worden, die nur in Situationen von Spendertransplantatmangel in Frage kommt (Verma 1999). Die Gründe für diese Einschätzung lagen vor allem in schlechten Visusergebnissen, die durch hohen oder irregulären Astigmatismus verursacht wurden (Jonas 2001).

Zur präoperativen Kalkulation von Transplantatgröße und Lokalisation wurden geometrische Modelle vorgeschlagen, um die präoperative Planung zu erleichtern. Die erforderliche Größe und Lokalisation des Transplantats hängt ab vom größten Kreis klarer Hornhaut und vom Abstand dieses Kreisbogens vom optischen Zentrum (Bourne 1978). In der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchung wurde der Endothelzellverlust von 7 autologen Rotationskeratoplastiken mit dem mittleren Zellverlust einer Gruppe von Patienten nach homologer Keratoplastik verglichen.

2.2.2. Material und Methoden

In diese Studie wurden 7 Patienten (3 Frauen und 4 Männer), die konsekutiv in unserer Klinik durch einen Chirurgen operiert wurden, eingeschlossen.

Die präoperative Endothelzelldichte wurde mittels eines Non-Kontakt-Spekularmikroskopes (NonCon Robo, Konan, Nishinomiya, Hyogo, Japan) bestimmt. Es wurde ein zentrales Photo sowie zusätzlich ein Bild aus jedem Quadranten der Peripherie gewonnen.

Die Rotation wurde nach der von Bourne (Bourne 1978) angegebene Technik ausgeführt. Bei 4 Patienten wurde die Rotation als einziger Eingriff durchgeführt. Bei zwei Patienten wurde außerdem eine anteriore Synechiolyse vorgenommen. Bei einem Patienten wurde die Operation als Triple-Prozedur mit extracapsulärer Kataraktextraktion und Hinterkammerlinsenimplantation ausgeführt.

Die verwendete Trepangröße reichte von 7,0 bis zu 8,5 mm mit einem Mittel von 7,64. Die Trepanation wurde mit dem Barron-Trepansystem vorgenommen. In allen 7 Patienten wurden doppelte fortlaufende Sternnähte verwendet (10-0 und 11-0 Nylon). Vor der Trepanation wurde Healon 5 in die Vorderkammer injiziert.

Die postoperative Therapie bestand aus lokalen Steroiden 3 x täglich für 2 Wochen und lokalen Gleitmitteln 12 mal täglich. Zu Vermeidung eines frühen postoperativen Druckerstiegs erhielten alle Patienten einmalig 500 mg Karboanhydrasehemmer (Diamox) intravenös am Tag der Operation.

Postoperative Kontrollen wurden alle 2 Wochen während der ersten 3 Monate durchgeführt, von da an alle 3 Monate. Erhoben wurden Sehschärfe, Astigmatismus, Vorderabschnittsbefund, intraokularer Druck und Fundusbefund. Die Endothelzelldichte wurde mittels Nonkontakt-Spekularmikroskopie bestimmt. Aufgrund der postoperativen vorübergehenden Schwellung der Transplantate konnten frühpostoperative Endothelzellbilder nicht aufgenommen werden. Der erste postoperative Endothelzellbefund wurde 3 Monate postoperativ erhoben.

Die Endothelzelldichten der autologen Transplantate wurden mit denen von 293 homologen Keratoplastiken verglichen, die von 1996 bis 2000 an der Augenklinik der Charité Campus Virchow Klinikum durchgeführt worden waren. Die Indikationen für diese Operationen umfassten Keratokonus, bullöse Keratopathie, Fuchs'sche Endotheldystrophie, Stromnarben, Herpes-Keratitis, Keratoplastik à chaud und Re-Keratoplastik (siehe unter 2.1.). Der jeweilige Anteil der Indikationen am Gesamtkollektiv ist in Abbildung 10a dargestellt.

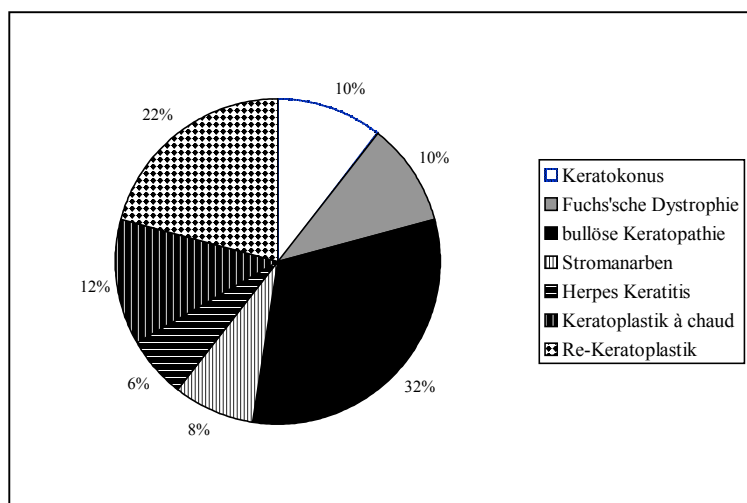


Abbildung 10a: Verteilung der Indikationen der Gruppe der homologen Keratoplastiken

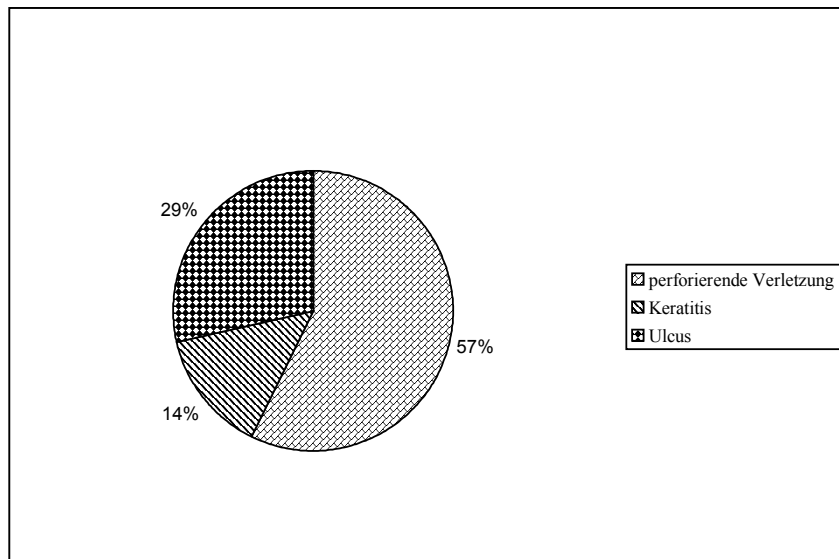


Abbildung 10b: Verteilung der Indikationen in der Gruppe der autologen Keratoplastiken

Darüber hinaus wurden die Endothelzellverläufe der autologen Gruppe einer Subgruppe der homologen Keratoplastiken, den Patienten mit Keratokonus (29 Patienten), gegenübergestellt

Die für die homologen Keratoplastiken verwendeten Transplantate stammten aus der Hornhautbank Berlin und wurden nach den Richtlinien der „European Eye Bank Association“ (EEBA) kultiviert. Als Kulturmedium wurde MEM- („Minimal essential medium“)-Earle’s (Biochrom, Berlin Germany) + 2 % fetales Kälberserum (FCS)(Gibco, Paisley, Scotland, UK) eingesetzt. Die mittlere Kulturzeit betrug 13 Tage.

Unterschiede im Endothelzellverlust zwischen autologen und homologen Transplantaten nach 12 und 24 Monaten postoperativ wurden mittels ungepaartem t-Test ausgewertet. Der prä- und postoperative Visus wurde mittels Wilcoxon-Test verglichen.

2.2.3. Ergebnisse

Die präoperativen Diagnosen der sieben autolog transplantierten Patienten umfassten 4 Hornhautnarben nach perforierender Verletzung, eine Hornhautnarbe nach Keratitis als Kontaktlinsenschaden, eine Narbe nach Hornhautulcus und eine Narbe infolge perforiertem Hornhautulcus. Das mittlere Alter der Patienten betrug 48,2 Jahre (20 bis 85 Jahre). Die präoperative Sehschärfe reichte von 1 / 50 bis zu 0,3. Während der präoperative keratometrische Astigmatismus zwischen 1,25 Dioptrien und 13 Dioptrien

(Mittelwert 3,3 Dioptrien) lag, reichte der präoperative refraktive Astigmatismus von 1,25 bis zu 5,5 Dioptrien (Mittelwert 3,3 Dioptrien).

Die präoperative mittlere Brechkraft der Hornhaut betrug 40,60 Dioptrien \pm 3,67 Dioptrien (34,75 – 44,50 Dioptrien). Die mittlere präoperative Endothelzellichte lag bei 2063 Zellen /mm², die Zellzahl reichte von 1200 bis zu 3000 Zellen /mm².

Vier Hornhäute hatten eine zentrale Stromanarbe und eine klare Peripherie, 3 Patienten hatten komplizierte Hornhautnarben mit anterioren Synechien. 4 Patienten waren pseudophak und waren mit Hinterkammerlinsen versorgt worden. Ein Patient hatte ein Sekundärglaukom nach perforierender Verletzung. Der intraokulare Druck bei diesem Patienten war präoperativ reguliert.

Keine der 7 Hornhäute hatte Neovaskularisationen. Zusätzliche okuläre Diagnosen auf dem operierten Auge außer der Hornhautnarbe waren: Amblyopie bei zwei Patienten (ein Patient mit perforierender Verletzung im Kindesalter und ein Patient mit Keratitis in der Kindheit) sowie altersabhängige Maculadegeneration (AMD) bei einem Patienten.

Die Sehschärfe stieg signifikant sowohl in der autolog- als auch in der homolog-transplantierten Patientengruppe an (Wilcoxon-Test). Der mittlere Anstieg der Sehschärfe in der autolog transplantierten Gruppe betrug 3,5 Zeilen. Der beste nach Rotationskeratoplastik erreichte Visus betrug 0,9, der schlechteste lag bei Handbewegungen. Der mittlere postoperative Astigmatismus lag bei 4,75 Dioptrien \pm 1,5 Dioptrien. Die Fadenentfernung wurde nach einem Jahr vorgenommen, wenn der Astigmatismus über 4 Dioptrien lag. In der homolog-transplantierten Gruppe betrug der keratometrische Astigmatismus 4,7 Dioptrien vor der Fadenentfernung und 4,4 Dioptrien nach der Fadenentfernung (siehe auch Abschnitt 2.2.). Die Unterschiede im Astigmatismus zwischen der homologen und der autologen Gruppe waren nicht signifikant. Bei zwei Patienten aus der autologen Gruppe traten im Laufe des Follow-up Komplikationen auf. Bei einem Patienten dekompensierte das Transplantat 6 Wochen postoperativ, so dass eine homologe Keratoplastik erforderlich wurde. Die Indikation für die Rotationskeratoplastik bei diesem Patienten hatte in einer Hornhautnarbe bestanden, die in Folge eines perforierten Ulcus aufgetreten war. Die autologe Keratoplastik war bei diesem Patienten als Triple Prozedur ausgeführt worden und die präoperative Endothelzellichte war in diesem Fall die niedrigste aus der gesamten Patientengruppe gewesen (1200 Zellen / mm²). Bei einem zweiten Patienten trat mehrere Monate nach der

Rotation eine komplizierte Amotio retinae auf, die eine Vitrektomie mit Silikonöltamponade erforderlich machte. Bei diesem Patienten waren der Rotationskeratoplastik mehrere komplizierte Vor-Operationen vorausgegangen, wozu Linsenextraktion, sekundäre Hinterkammerlinsenimplantation und Hinterkammerlinsenreposition gehörten.

Der mittlere Endothelzellverlust nach einem Jahr in der Gruppe der autologen Keratoplastiken lag bei $15\% \pm 7,19$, im Vergleich zu $35\% \pm 15,16$ in der homolog transplantierten Gruppe von Keratokonus-Patienten und $40\% \pm 21,34$ in allen 293 homologen Keratoplastiken. Der Endothelzellverlust nach zwei Jahren lag bei $44\% \pm 16,5$ bei den Normalrisikokeratoplastiken mit Keratokonus und bei $49\% \pm 21,98$ bei allen 293 homologen Keratoplastiken. Bei den autologen Keratoplastiken lag der Endothelzellverlust nach 24 Monaten bei $19,3\% \pm 7,32$.

Der Endothelzellverlust der 293 homologen Keratoplastiken ist in Abbildung 11 gezeigt.

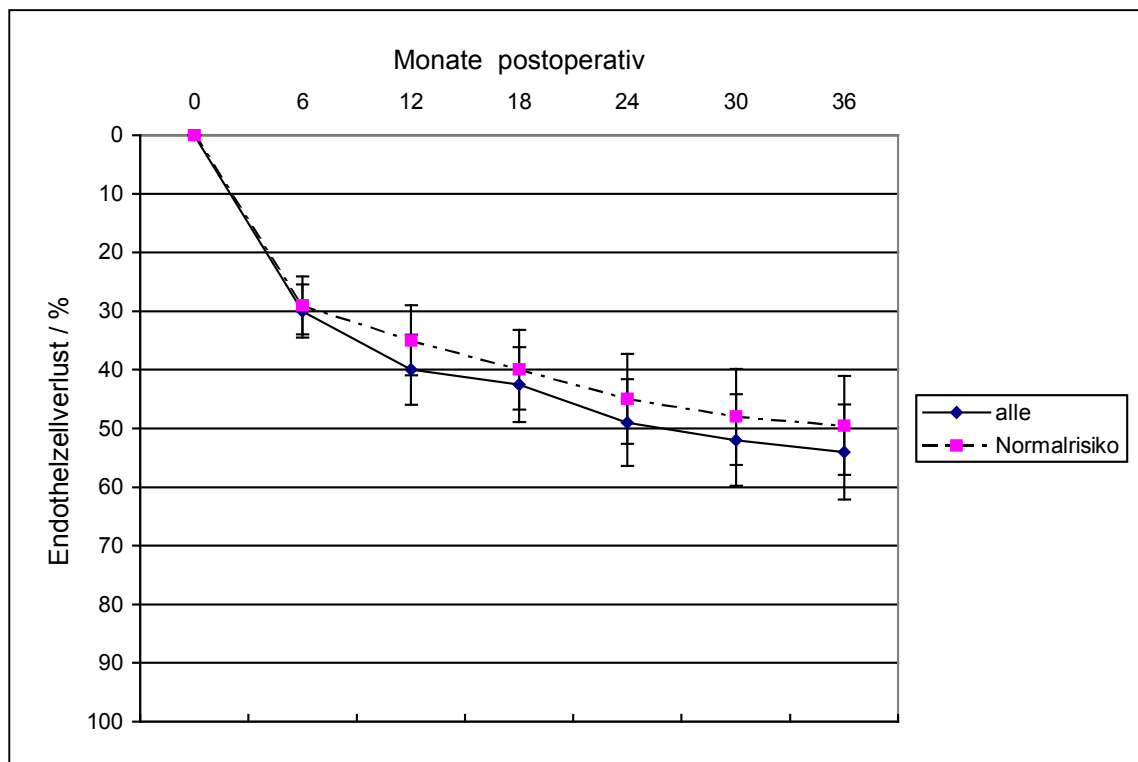


Abbildung 11: Endothelzellverlust von 293 homologen Keratoplastiken und 29 Normalrisikokeratoplastiken (Keratokonius)

Darüber hinaus zeigt die Abbildung den Endothelzellverlust der 29 Normalrisikokeratoplastiken mit Keratokonus. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren nicht signifikant. Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich des Endothelzellverlustes zwischen autologen und homologen Keratoplastiken. Die Unterschiede waren statistisch signifikant nach 12, 24 und 36 Monaten ($p < 0,05$) für den Vergleich homologe (alle Indikationen) versus autologe Transplantationen und für den Vergleich Normalrisiko-Keratoplastiken (Keratokonusergruppe) versus autologe Keratoplastiken (Abbildung 13).

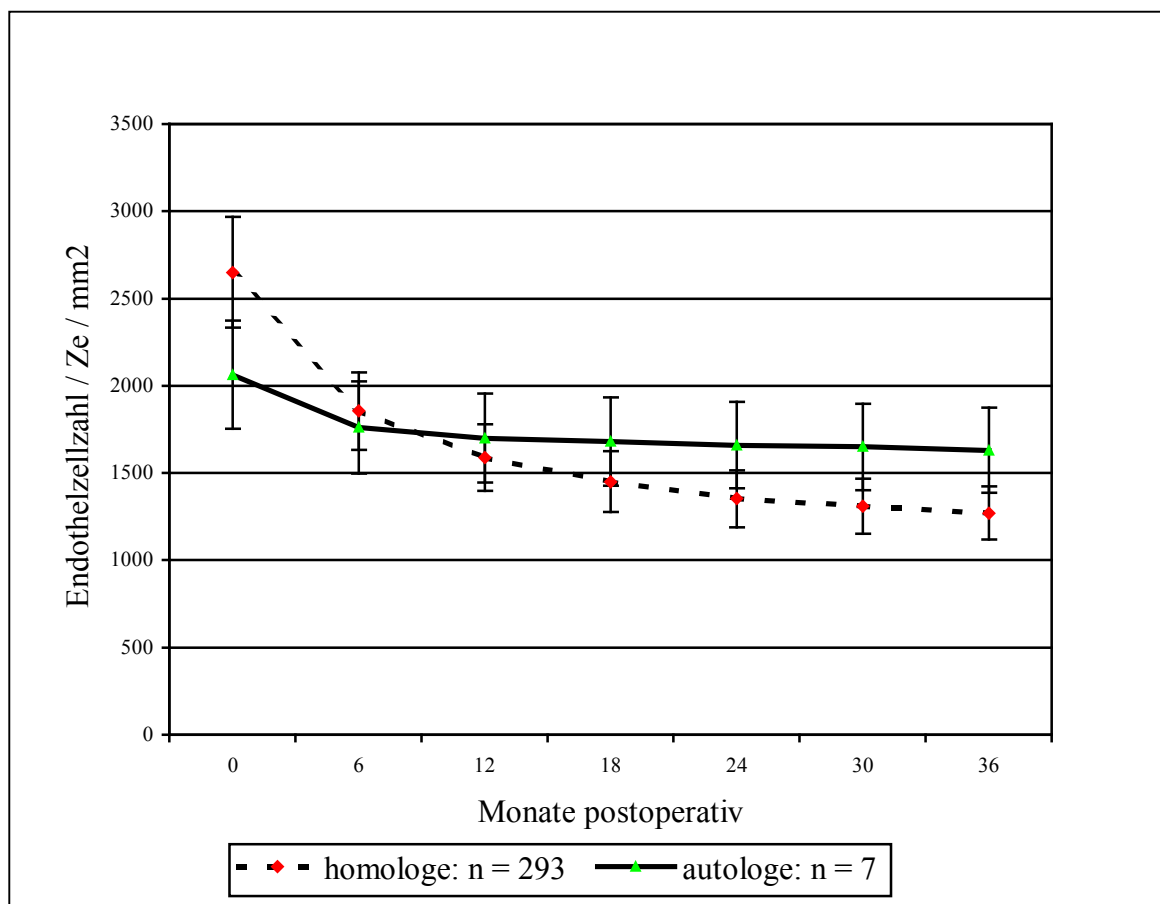


Abbildung 12: Vergleich der Endothelzellzahl von 293 homologen und 7 autologen Keratoplastiken

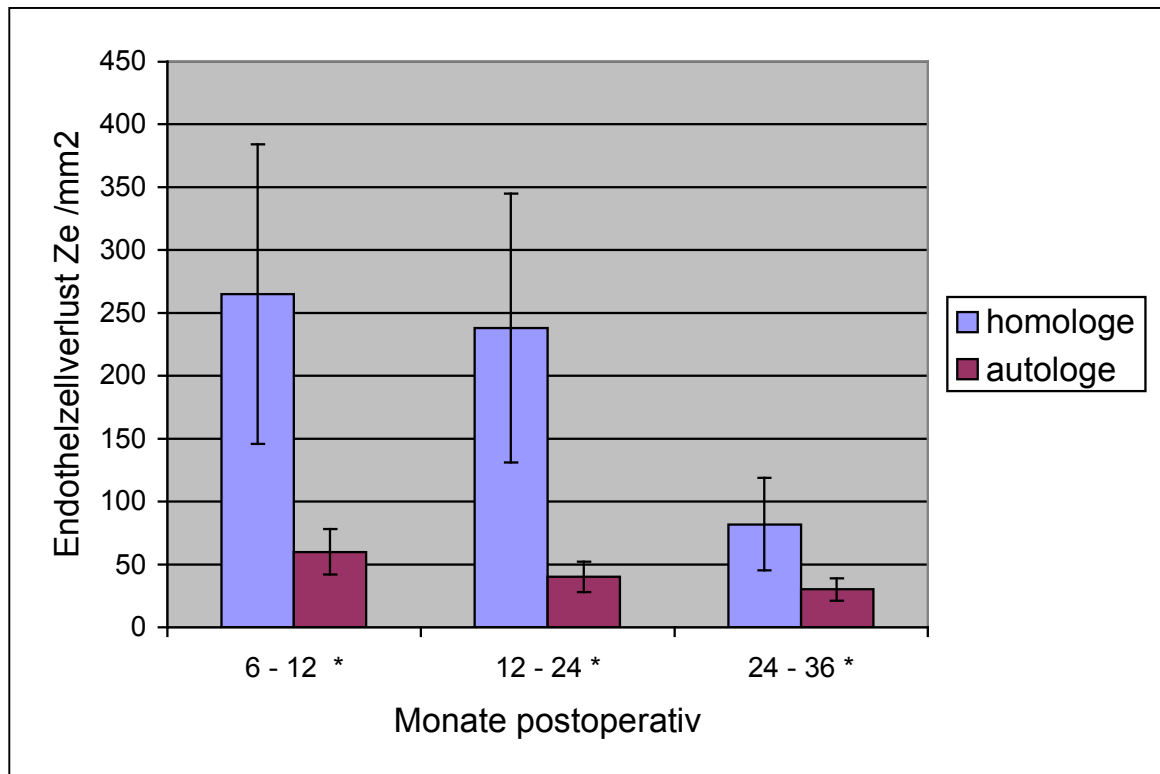


Abbildung 13: Vergleich der Abnahme der Endothelzellzahl von 293 homologen und 7 autologen Keratoplastiken

2.2.4. Diskussion

In dieser Untersuchung demonstrierten wir die Ergebnisse einer verhältnismäßig kleinen Anzahl von Patienten nach autologer Rotationskeratoplastik. Die Indikationen für diese spezielle Form der Keratoplastik sind selten, so daß alle Studien über diese Operationstechnik vergleichbar kleine Patientenzahlen einschließen (Jonas 2001, McDonnell 1989, Matsuda 1988, Murthy 2001). Alle in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten hatten eine komplizierte Ausgangssituation, wie in Abbildung 10b gezeigt ist. Das Visusergebnis ist dem Ergebnis von homologen Keratoplastiken bei komplizierter Ausgangssituation vergleichbar und insbesondere der Astigmatismus liegt in derselben Größenordnung wie derjenige der homolog transplantierten Hornhäute. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Jonas et al. (Jonas 2001), die über einen signifikant höheren Astigmatismus in der autolog transplantierten Gruppe berichteten. Die

Verwendung von doppelten fortlaufenden Sternnähten bei unseren Patienten könnte dazu beitragen, diesen Unterschied zu erklären.

Der Endothelzellverlust war in der autologen Gruppe signifikant geringer als in der homologen Gruppe. Hier soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass das späte Endothelversagen als der wichtigste Grund für eine späte Transplantatdekomensation nach homologer Keratoplastik angesehen wird (Nishimura 1999).

Der Vergleich der präoperativen Endothelzellichten zwischen autologen und homologen Transplantaten ist insofern problematisch, als die homologen Transplantate einer möglichen zusätzlichen Endothelbelastung durch die Präparation und die Organkultur ausgesetzt sind (Bourne 1984). Auf der anderen Seite ist bereits nachgewiesen worden, dass es über zwei Jahre postoperativ keine signifikanten Unterschiede im Endothelverlust zwischen in Gewebekulturmedium konservierten Transplantaten (Optisol®) und organkultivierten Hornhäuten gibt (Frueh 2000). Ein frühpostoperativer Endothelzellvergleich ist in der Regel nicht möglich, da die Transplantate eine vorübergehende Schwellung und Transparenzminderung durchlaufen und dann spekularmikroskopisch keine Endothelzellbilder erhebbbar sind.

Dennoch ist festzuhalten, daß die Unterschiede in der Endothelzellichte zwischen der homologen und der autologen Gruppe im Verlauf von 3 Jahren ansteigen, was nicht allein durch einen möglichen Endothelzellschaden in der Organkultur erklärt werden kann. Nach dem ersten Jahr gibt es nur eine minimale zusätzliche Endothelzellminderung bei den autologen Transplantaten. Immunreaktionen können naturgemäß in den autologen Transplantaten nicht auftreten. Daher ist nur eine kurzzeitige lokale Steroidtherapie nach der autologen Transplantation erforderlich- wenn überhaupt nötig. Aus diesem Grund lassen sich nach der Rotationskeratoplastik auch steroid-induzierte Komplikationen wie das Sekundärglaukom vermeiden.

Die signifikant reduzierte Endothelverlustrate der autologen Transplantate unterstützt die Hypothese einer für den schleichenden Endothelzellverlust verantwortlichen chronischen subklinischen Immunreaktion bei den homologen Transplantaten. Aufgrund der eng begrenzten Indikation werden Rotationskeratoplastiken auf seltene Ausgangssituationen begrenzt bleiben. In ausgewählten geeigneten Situationen könnte die Rotationskeratoplastik aber der homologen Transplantation im Hinblick auf das Langzeittransplantatüberleben überlegen sein.

3. Zusammenfassung Teil A

Die in diesem Abschnitt zusammengestellten klinischen Daten lieferten aufschlussreiche, neue Informationen sowohl bzgl. der Risikofaktoren für den chronischen Endothelzellverlust nach Keratoplastik als auch bzgl. der möglichen Genese dieses Zellverlustes. Daraus ableitbar sind neue Optionen für zukünftige Behandlungsansätze. Zum einen konnte das Glaukom eindeutig als Risikofaktor für den Endothelzellverlust nach homologer Keratoplastik belegt werden. Demgegenüber sind hohes Spenderalter und hohe initiale Endothelzellzahl des Spenders nach unserer Untersuchung keine Risikofaktoren für einen höheren Endothelzellverlust nach homologer Keratoplastik. Darüber hinaus konnten unsere Untersuchungen erstmalig zeigen, dass der chronischen subklinischen Immunreaktion neben anderen Faktoren wie Zellaustausch zwischen Spender und Empfänger eine wesentliche Bedeutung für die Genese des chronischen Endothelzellverlustes nach der homologen Hornhauttransplantation zukommt. Die Analyse des klinischen Verlaufs der Patienten mit autologer Rotationskeratoplastik konnte darüber hinaus zeigen, dass die Rotationskeratoplastik in ausgewählten, geeigneten Situationen der homologen Keratoplastik überlegen sein kann und nicht pauschal als minderwertigerer Ersatz bei Spendermangel anzusehen ist.

Die sich daraus ableitenden Konsequenzen für die klinische Umsetzung bestehen darin, dass die konsequente und ausreichende Regulierung des intraokularen Drucks zu den wesentlichen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Keratoplastik gehört und dass intraokulare Tensiokontrollen bei Keratoplastik-Patienten in unsicheren Fällen eher häufiger durchgeführt werden sollten. Weiterhin sollte der Einsatz von eher kleinen Transplantaten den Einfluss einer chronischen Immunreaktion auf den Endothelzellverlust vermindern. Außerdem ist aufgrund der Bedeutung des chronischen Endothelzellverlustes für das langfristige Transplantatüberleben die langfristige bis dauerhafte lokale Steroidapplikation nach homologer Keratoplastik empfehlenswert (beispielsweise Dexamethason 1 x tgl. auf Dauer).