

Untersuchungen zur Vitalität des Hornhautendothels in einem neuen System zur Hornhautkultivierung

J. Garweg und M. Böhnke

Augenklinik, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Bundesrepublik Deutschland

Zusammenfassung. In einem neu entwickelten System zur Hornhaut-Langzeitkultivierung ist das Gewebe in einem Halter senkrecht in einem Abstand von 1 mm von der Gefäßwand untergebracht. Dadurch ist eine Befundung der Hornhaut an der Spaltlampe, am Spiegelmikroskop und am Phasenkontrastmikroskop möglich. Auf eine Nahtfixation des Gewebes kann verzichtet werden. Durch die wandnahe Position der Korneoskleralscheibe, die mit der Gefäßwand einen vorderkammerähnlichen Raum mit einer spaltförmigen Öffnung zum Medienaustausch bildet, ist jedoch eine Minderversorgung des Endothels denkbar.

Deshalb verglichen wir den Rückgang der Endothelzell-dichte in der Organkultur bei dieser wandnahen Fixierung des Transplantates und bei der herkömmlichen Methode, in der das Gewebe frei von Medium umspült wird. Zur Darstellung der Medienkonvektion wurde in diesem System die Verteilung eingefärbten Nährmediums in dem vorderkammerähnlichen Raum auf der endothelialen Seite des Transplantates untersucht.

Die Ergebnisse zeigen eine freie Zirkulation des Kulturmediums, die allerdings durch eine nicht exakte Präparation des skleralen Randes behindert werden kann. Unterschiede in der Endothelzell-dichte nach Kultur fanden sich im Vergleich nicht (Endothelzell-dichte nach Kultur in dem neuen Kultursystem 2553 Z/mm^2 , in dem herkömmlichen 2563 Z/mm^2 , Endothelzellverlust in der Kultur 477 bzw. 380 Z/mm^2 ; $p = 0,955$).

Schlüsselwörter: Hornhautkultur, neues Hornhautkultursystem, Nahtfixierung des Gewebes, Endotheltrophik, Endothel-Befundung, Endothelzellverlust, Phasenkontrastmikroskop, Spiegelmikroskop.

The viability of the corneal endothelium in a new cornea storage system

Summary. In a new cornea storage system the tissue is fixed in upright position in a distance of 1 mm from the wall of the culture dish. Thus, an examination of the cornea with slitlamp, inverted phase microscope and specular microscope can be done. A suture fixation of the tissue is not required.

Due to the formation of an artificial anterior chamber between the graft and the culture dish the endothelial nutrition might be reduced.

Therefore we studied the endothelial cell survival as compared to a control group with the corneoscleral disc suspended in the middle of the culture dish. Additionally we constructed a model for the investigation of medium circulation.

We found a free circulation of the culture medium on the endothelial side of the cornea in the new cornea storage system. To ensure a sufficient exchange of culture medium, the corneoscleral disc has to be precisely dissected with a 15 mm trephine. In the organ culture we found no difference in the endothelial cell counts in both groups after culture (endothelial cell counts after culture in the new cornea storage system 2553 c/mm^2 as compared to 2563 c/mm^2 in the conventional system, cell loss in culture 477 and 380 c/mm^2 respectively; $p = 0.955$).

Key words: Cornea storage, new cornea storage system, suture tissue fixation, inverse phase microscope, mirror microscope, endothelial nutrition, endothelial examination, endothelial cell loss.

Einleitung

Die Langzeitkultivierung von Spenderhornhautgewebe ist inzwischen wegen der Ermöglichung einer kontinuierlichen Versorgung mit Spendergewebe zur Keratoplastik als Routinemethode in der Ophthalmologie eingeführt. Die Aufgabe der Organkultur liegt in der Konservierung von Spenderorganen zur Transplantation, um Zeit für die Organisation und Einbestellung eines geeigneten Empfängers, für die erforderliche Serodiagnostik des Spenders und die Vorbereitung der Operation zu gewinnen. Außerdem stellt sie eine wichtige *In-vitro*-Vitalitätsprüfung des Transplantates dar.

In der Organkultur soll die Hornhaut senkrecht von Kulturmedium umspült gelagert werden, um ein Absinken von Detritus auf das Endothel zu verhindern. Gleichzeitig soll ein ausreichender Stoffwechsel des Endothels ermöglicht und ein konstantes physiologisches Milieu für das Transplantat erreicht werden [1].

In der herkömmlichen, von Sperling erstmals beschriebenen Methode [2] wird das Gewebe in 50-ml-Rundgefäßen mit einer Seidennaht am Flaschenstopfen fixiert. Es hängt

freischwimmend im Kulturmedium in der halbgefüllten Flasche, um den notwendigen Sauerstoffaustausch zu ermöglichen. Für den Transport wird das Gefäß vollständig mit Kulturmedium aufgefüllt, um die vorhandenen mechanischen Einflüsse und Turbulenzen während des Transportes gering zu halten.

Bei dem beschriebenen System zur Hornhautkonservierung ist makroskopisch die Farbe und damit der pH der Lösung gut beurteilbar, eine mikroskopische Beurteilung der Sterilität jedoch nicht durchführbar.

Die Nahtfixation bedeutet ein potientes Trauma für das Gewebe. Eine Beurteilung des freischwimmenden Gewebes an der Spaltlampe ist schwer möglich. Für praktisch jede Manipulation muß die Kultur eröffnet werden, für die Befundung des Transplantates am Mikroskop muß das Gewebe sogar aus der Kultur entnommen werden. Dabei kann es leicht zu einer Kontamination der Kultur kommen.

Wir suchten nun eine geeignete Methode, Hornhautgewebe zu lagern, die bei allen Vorteilen des herkömmlichen Systems eine Beurteilung des Gewebes an der Spaltlampe, am Spiegelmikroskop und am Phasenkontrastmikroskop erlaubt. Dazu war jedoch eine wandnahe Positionierung des Gewebes im Kulturgefäß erforderlich.

In dem gemäß unseren Anforderungen konzipierten System wird die Korneoskleralscheibe durch eine Halterung in einem Abstand von exakt 1 mm von der Gefäßwand positioniert, so daß ein vorderkammerartiger Raum zwischen dem Transplantat und der Gefäßwand entsteht [3]. Durch die wandnahe Position des Gewebes kann jedoch die Ernährung des Endothels behindert werden. Deshalb untersuchten wir vergleichend die Versorgung des Endothels in der Vitalkultur und zusätzlich die Medienkonvektion in einem Medienverteilungsmodell.

Material und Methoden

Für das beschriebene Kultursystem wurde eine handelsübliche Zellkulturflasche mit einem Volumen von 50 ml und einem Halsdurchmesser von 16 mm (Fa. Nunc, Best.-Nr. 3013) verwandt. Dazu passend wurde eine Halterung aus nichtzelltoxischem Polyäthylen (Fa. Bayer) entwickelt, mit der ohne weitere Manipulation die Fixation des Gewebes in einer bestimmten Position des Gefäßes möglich ist.

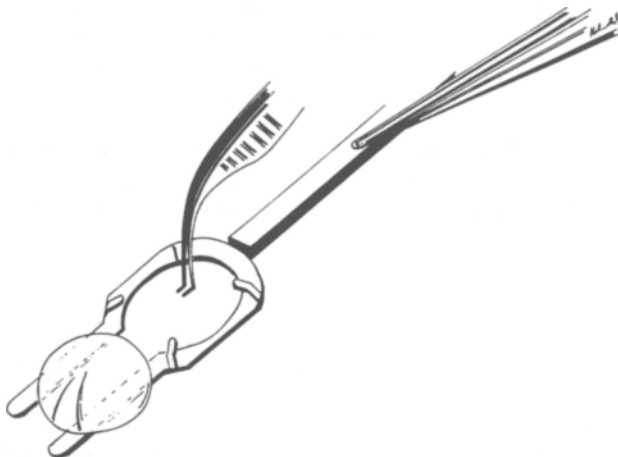


Abb. 1. Einziehen der Korneoskleralscheibe unter leichten Rotationsbewegungen in die Halterung

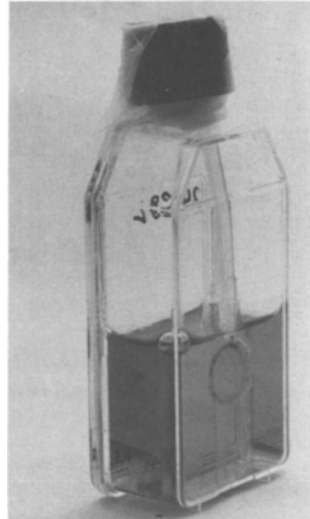


Abb. 2. Hornhautkultursystem

Die Einbringung des Gewebes in die Kultur geschieht nach folgender Technik: Zunächst wird eine Korneoskleralscheibe von 15 mm Durchmesser trepaniert und präpariert. Auf eine saubere Präparation des skleralen Randes sollte dabei besonderer Wert gelegt werden, um eine Verlegung der spaltförmigen Öffnungen hinter die Halterung durch überhängende Gewebeteile zu vermeiden, da dies zu einer Reduktion der Medienzirkulation führt. Unter leichten Rotationsbewegungen wird das Gewebe über eine Schiene in die Halterung eingezogen und durch vier entsprechend geformte Kunststoffklammern in der Halterung fixiert (Abb. 1).

Auf der Rückseite der Halterung befinden sich vier Noppen von 0,3 mm Höhe zur Wahrung einer Mindestdistanz zur Gefäßwand. Zusätzlich weist die Halterung eine Lücke in der Ringplatte unten auf, die eine Vergrößerung des Zirkulationsvolumens bewirken soll und verhindert, daß sich Zelldetritus am unteren Rand des Halterungssystems ansammeln kann.

Die Halterung weist oben im Stopfen eine zentrale Bohrung auf, um mikrobiologische Proben ohne Entfernung der Halterung aus dem Gefäß entnehmen zu können.

Die Halterung wird nun in das Kulturgefäß eingebracht, wo das Gewebe mit der endothelialen Seite zur Wand untergebracht ist und am korneoskleralen Rand in einem Abstand von exakt einem Millimeter der Wand des Kulturgefäßes anliegt. Dieser Abstand ergibt sich aus der Dicke der Halterung und der vier Distanznoppen und ist zur ausreichenden Medienzirkulation auf der endothelialen Seite des Gewebes erforderlich. Damit ist die Korneoskleralscheibe so fixiert, daß eine Beurteilbarkeit an der Spaltlampe, am Phasenkontrastmikroskop und am Spiegelmikroskop möglich ist. Sie ist ohne weitere Manipulation transportfähig [3] (Abb. 2).

Alternativ kann die Halterung um 180 Grad gedreht in das Kulturgefäß eingebracht werden. Auch dann kann das Sediment mikroskopisch beurteilt werden und das Gewebe an der Spaltlampe untersucht werden. Eine spiegelmikroskopische oder phasenkontrastmikroskopische Beurteilung des Endothels ist jedoch nicht möglich.

In der Vitalkultur untersuchten wir, ob die Medienzirkulation auf der endothelialen Seite des Gewebes zu dessen Versorgung ausreicht. Dafür wurden von 17 Hornhautpaaren

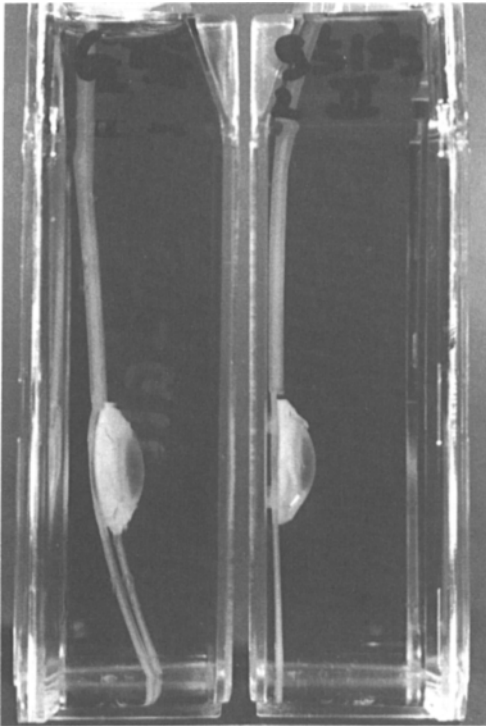


Abb. 3. Hornhaut in wandnaher und um 180 Grad rotierter Halterungsposition im Kulturgefäß

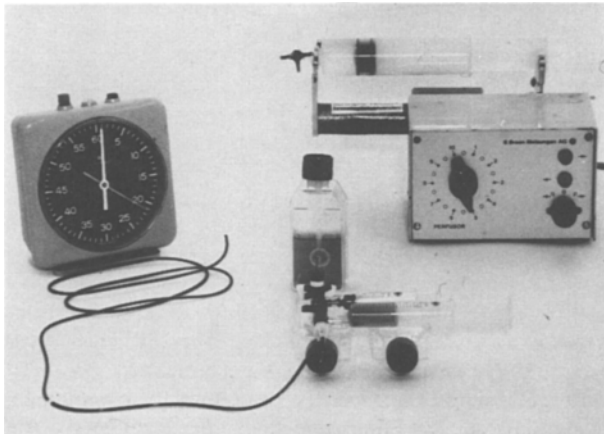


Abb. 4. Medienzirkulationsdarstellung mittels Perfusor-Farbinjektions-System in dem neuen Kultursystem

je eines zur Gefäßwand hin (Gruppe 1) und eines um 180 Grad rotiert (Gruppe 2) in ein Kulturgefäß eingebracht (Abb. 3). Endothelbefundung und Befunddokumentation erfolgten am Phasenkontrastmikroskop vor Kulturbeginn und unmittelbar vor der Transplantation, nachdem mikrobiologisch die Sterilität der Kultur erwiesen war. Die Endotheldichte wurde zentral in einem repräsentativen Hornhautbezirk durch Auszählen der Zellzahl auf einer definierten Fläche von $20\ \mu\text{m}$ (Fixed-frame-Technik) bestimmt. Der Umfang des Endothelzellverlustes während der Kultur wurde für beide Gruppen ermittelt und statistisch ausgewertet.

Zur Darstellung der Konvektion des Kulturmediums wurde ein Modell konstruiert, mit dem eine Farbverteilungs-

untersuchung auf der endothelialen Seite der Kultur möglich war. Dabei wurden mit einem Perfusor-Injektions-System $50\ \mu\text{l}$ einer 1,5-prozentigen wäßrigen Trypanblaulösung in Nährmedium unter isothermen Bedingungen verwirbelungsfrei innerhalb dreißig Sekunden retroendothelial appliziert und die Farbstoffverteilung zeitgesteuert photographisch dokumentiert (Abb. 4).

Ergebnisse

Zur Untersuchung der Vitalität des Gewebes in der Organkultur wurden 17 Hornhautpaare ausgewertet. Da die Zuordnung zu den beiden Gruppen immer paarweise von einem Spender erfolgte, können die Spenderdaten bei der statistischen Betrachtung außer Betracht gelassen werden.

Die mittlere Kulturdauer in den beiden Gruppen betrug 13,5 (2–34) und 13,9 (2–34) Tage.

Die Gruppen zeigten statistisch keinen Unterschied bezüglich der Ausgangsendothelzelldichte [Mittelwerte für Gruppe 1 3038 ± 310 (2600–3500) Z/mm^2 , für Gruppe 2 2947 ± 252 (2500–3300) Z/mm^2 ; $p = 0,353$]. Nach Ausschluß der Endothel-Nekrose-Paare (s. o.) betragen die Ausgangsendothelzelldichten 3030 ± 310 (2600–3500) Z/mm^2 bzw. 2943 ± 255 (2500–3300) Z/mm^2 ($p = 0,410$; Tabelle 1).

In der Endbefundung fanden sich in der Gruppe mit wandnaher Unterbringung der Korneoskleralscheibe (Gruppe 1) zwei Endotheltotalnekrosen.

Unter Einschluß aller Hornhäute fanden wir am Ende der Kultur eine mittlere Endothelzelldichte von 2253 ± 982 (0–3400) Z/mm^2 für wandnah fixierte Gewebe (Gruppe 1), 2574 ± 403 (1750–3200) Z/mm^2 für mitten im Medium fixierte Gewebe (Gruppe 2). Dies entspricht einem mittleren Endothelzellverlust von $785\ \text{Z}/\text{mm}^2$ für Gruppe 1 und von $373\ \text{Z}/\text{mm}^2$ für Gruppe 2. Schließt man die Hornhautpaare mit Totalnekrosen von der statistischen Betrachtung aus, findet sich für Gruppe 1 eine mittlere Endotheldichte von 2553 ± 530 (1300–3400) versus 2563 ± 419 (1750–3200) Z/mm^2 für Gruppe 2 entsprechend einem mittleren Endothelzellverlust von 477 versus $380\ \text{Z}/\text{mm}^2$ in der Endbefundung.

Somit findet sich kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Verlustes an Endothelzellen in der Kultur ($p = 0,222$ bei Einschluß aller Hornhautpaare, $p = 0,955$ bei Ausschluß der Endothel-Nekrose-Paare; Tabelle 1).

Im Farbverteilungsmodell zeigte sich nach Entstehen eines gleichmäßigen Farbpilzes in dem vorderkammerähnlichen Raum hinter der Hornhaut ein ungehindertes Entweichen und eine rasche Diffusion des Farbstoffes nach oben, so daß bereits nach fünf Minuten nur noch ca. 20% des Farbstoffes am Applikationsort waren. Nach 15 Minuten fanden wir eine fast vollständige Verteilung des Trypanblaus aus dem vorderkammerähnlichen Raum zwischen der Hornhauthalterung und der Gefäßwand zur Oberfläche der Lösung hin.

Diskussion

In der herkömmlichen Technik der Hornhautkonservierung wird das Gewebe mit einer Seidennaht am Gefäßstopfen fixiert [5].

Das Gewebe ist in der Kultur senkrecht freischwimmend untergebracht, um eine Ansammlung von Zelldetritus auf dem Endothel zu verhindern [1].

Zur Entnahme mikrobiologischer Proben ist ein Durch-

Tabelle 1 a. Rückgang der Endothelzelldichte während der Kultur gesamt

<i>Endothelzelldichte pro mm² gesamt (n = 17 je Gruppe)</i>			
Gruppe 1 (wandnahe)	vor Kultur	3 038	
	nach Kultur	2 253	
	Differenz	785	
Hornhautfixierung			
Gruppe 2 (180° rotiert)	vor Kultur	2 947	
	nach Kultur	2 573	
	Differenz	373	p = 0,222
Gruppe 1: Gewebe wandnah im Kulturgefäß Gruppe 2: Gewebe um 180° rotiert, frei von Medium umspült			

Tabelle 1 b. Rückgang der Endothelzelldichte während der Kultur nach Ausschluß der beiden Nekrosepaare

<i>Endothelzelldichte pro mm² ohne Endothel-Nekrose-Paare (n = 15 je Gruppe)</i>			
Gruppe 1 (wandnahe)	vor Kultur	3 030	
	nach Kultur	2 553	
	Differenz	477	
Hornhautfixierung			
Gruppe 2 (180° rotiert)	vor Kultur	2 943	
	nach Kultur	2 563	
	Differenz	380	p = 0,955
Gruppe 1: Gewebe wandnah im Kulturgefäß Gruppe 2: Gewebe um 180° rotiert, frei von Medium umspült			

stechen des Stopfens des Kulturgefäßes notwendig. Eine mikroskopische Beurteilung des Sedimentes der Kultur ist nicht durchführbar. Eine Beurteilung des Spendergewebes an der Spaltlampe ist möglich, jedoch durch das freie Schweben des Gewebes in der Kultur erschwert. Für die Beurteilung des Endothels am Spiegelmikroskop und am Phasenkontrastmikroskop muß das Gewebe aus der Kultur entnommen werden.

Damit ist eine Zwischenbefundung des Endothels zur Verlaufskontrolle nicht möglich, ohne die Kultur zu eröffnen. Das bedeutet, daß dann erneut ein Sterilitätsnachweis erbracht werden muß.

Mit dem neuen System zur Langzeitkonservierung von Spendergewebe zur Keratoplastik kann auf eine Nahtfixierung des Gewebes durch die vier elastischen Spangen am Halter verzichtet werden. Die senkrechte Unterbringung des Gewebes in der Kultur ist auch in dem neuen System realisiert. Durch die Fixierung des Gewebes in dem Hornhalthalter wird eine Spaltlampenuntersuchung des Gewebes erleichtert. Dies gilt für beide Stellungen, in denen der Halter in das

Kulturgefäß eingebracht werden kann, sowohl die wandnahe als auch die um 180 Grad rotierte, bei der das Gewebe frei im Medium ruht.

Durch eine Bohrung in dem Stopfen des Hornhalthalters können Probeentnahmen der Kulturflüssigkeit zur mikrobiologischen Anzucht unproblematisch durchgeführt werden. In dem Aufbewahrungsgefäß, das aus der Zellkulturtechnik stammt, ist das Sediment jederzeit problemlos mikroskopisch beurteilbar. Die fixe Unterbringung der Hornhaut nahe der Gefäßwand erlaubt eine Untersuchung des Gewebes am Spiegelmikroskop und Phasenkontrastmikroskop, ohne die Kultur eröffnen oder das Gewebe manipulieren zu müssen. Hierdurch ist eine Zwischenbefundung der Endothelvitalität zur Verlaufsbefundung möglich, ohne einen Bruch der Sterilität der gesamten Kultur zu riskieren [3].

Somit stellt das System eine deutliche Verbesserung der herkömmlichen Methode dar. Aber es sind zwei Fälle einer Endotheltotalnekrose vorgekommen. Die einzige Ursache dafür ist unseres Ermessens in einer mangelnden Versorgung des Endothels zu sehen, die durch eine verminderte Medien-

zirkulation infolge stehengebliebener Gewebereste entstanden ist, welche zu einer Verlegung der Zirkulationsöffnung in der Halterung geführt haben. Dies zeigt die Anfälligkeit des vorgestellten Systems gegenüber unsauberer Präparation des Gewebes. Die Halterung wies für die hier vorgestellten Untersuchungen auf der Rückseite vier Noppen von 0,3 mm Höhe als Distanzhalter auf (siehe oben). In Konsequenz der beiden Fälle einer Endotheltotalnekrose wurde nach Abschluß dieser Untersuchungen die Noppenhöhe auf 0,8 mm vergrößert. Dadurch hat das Gewebe eine Mindestentfernung von 1,5 mm von der Gefäßwand, so daß die mikroskopischen Untersuchungen des Endothels in der Kultur noch möglich sind, ein Verschluß der Öffnungen zur Medienzirkulation jedoch unwahrscheinlich geworden ist. Weitere Fälle von endothelialen Totalnekrosen wurden seither nicht beobachtet.

Die Zellzahlen nach Kultur zeigen einen Rückgang der Endothelzellichte in beiden Gruppen, der statistisch signifikant ist und in ähnlichem Umfang auch für das von Sperling beschriebene System beschrieben worden ist [1, 4]. Ein Unterschied zwischen den Gruppen fand sich nicht.

Wenn man die beiden Endothel-Nekrose-Fälle in die Bewertung einbezieht, läßt sich ein geringer, statistisch jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen ($p = 0,249$). Bleiben die beiden Endothel-Nekrose-Fälle unberücksichtigt, ist der Umfang des Zellrückganges während der Kultur sogar praktisch gleich ($p = 0,955$). Somit kann zumindest ein systematischer Fehler des neuen Systems ausgeschlossen werden.

Mit der Untersuchung der Medienverteilung konnte gezeigt werden, daß eine ungehinderte Zirkulation der Nährflüssigkeit in dem vorderkammerähnlichen Raum hinter der Hornhalthalterung stattfindet. Dieses Ergebnis paßt zu unseren Beobachtungen einer unauffälligen Endotheldichte und -morphologie der untersuchten Gewebe im Vergleich mit der herkömmlichen Kulturmethode gemäß einer Kulturdauer von bis zu sechs Wochen [2].

Ausreichende Erfahrungen mit dem Transport von Spendergewebe in dem System liegen nicht vor. Eigene Versuche zur Strömungsdynamik in der Kultur haben gezeigt, daß eine kräftige Rotation der Flasche um die sagittale Querachse notwendig ist, um die Hornhaut aus der Halterung zu lösen.

Da eine feste Form des Gewebes für die Unterbringung in der Halterung erforderlich ist, ist das System für Spendergewebe geringerer Rigidität, wie zum Beispiel von Kleinkindern, ungeeignet. Gleiches gilt auch für tierische Hornhaut.

Der unmittelbare Vergleich gepaarter Hornhäute unter bis auf die Unterbringung in der Kultur identischen Bedingungen zeigt, daß eine Schädigung des Endothels durch die wandnahe Anordnung in dem neuen Kultursystem nicht erwartet werden muß.

Literatur

1. Sperling S (1979) Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmologica* 57: 269–276
2. Sperling S (1978) Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmologica* 56: 785–792
3. Böhnke M (1989) Ein neues System zur Lagerung von Spenderhornhäuten. *Klin Monatsbl Augenheilkd* (zur Veröffentlichung eingereicht)
4. Böhnke M, Draeger J, Bornemann D, Steinhorst U (1985) Einfluß der Kulturtechnik auf die Ergebnisse nach Hornhautkonservierung. *Klin Monatsbl. Augenheilkd* 187: 109–112
5. Lindstrom RL, Doughman DJ, Skelnik DL, Mindrup EA (1986) Minnesota system corneal preservation. *Br J Ophthalmol* 70: 47–54

Korrespondenz: Dr. J. Garweg, Augenklinik, Universitätsklinikum Eppendorf, Martinistraße 52, D-2000 Hamburg 20, Bundesrepublik Deutschland.