

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

Klinikdirektor: Univ.- Prof. Dr. med. G. Richard

30 Years of Cornea Cultivation Long-term Experience in a single Eye Bank

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Mau-Thek Eddy

Hamburg 2012

[

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.09.12**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof.Dr.med. Richard

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD. Dr.med. Sperhake

Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Einleitung

Die Hornhauttransplantation ist oft die einzige Methode korneale Blindheit zu behandeln. Sie wurde erstmalig erfolgreich im Jahre 1905 als eine der ersten Transplantationen in der Medizingeschichte durchgeführt und ist zurzeit die am häufigste durchgeführte Transplantation weltweit (Seitz et al. 2005). Durch die Verpflanzung einer klaren vitalen Spenderhornhaut erreicht man bei Patienten mit hereditären, infektiösen oder traumatischen Hornhauterkrankungen sowohl eine Stabilisierung des Auges als auch eine Visusverbesserung (Naydis et al. 2011). Von Anfang an bestand ein Mangel an qualitativ guten Spenderhornhäuten, welche damals direkt vom Spenderauge ohne Qualitäts- oder Sterilitätskontrollen explantiert und auf den Empfänger übertragen wurden. Im Jahre 1935 veröffentlichte Filatov (Filatov 1935) ein neuartiges Konzept über eine Institution, welche die Spende, Beschaffung, Untersuchung, Verarbeitung, Kultivierung und Verteilung von Hornhautgewebe organisiert. Neun Jahre später wurde eine solche Einrichtung in Form einer „Eye-Bank“ („Hornhautbank“) in New York erstmalig gegründet, welche zunächst weltweit eine Vorreiterstellung innehatte. Seither wurde die Methodik der Kultivierung der Spenderhornhäute stetig verbessert. Durch den hohen Qualitäts- und Sicherheitsstandard in einer Hornhautbank erreicht man heute deutlich bessere Operationsergebnisse, postoperative Verläufe mit guten Kurz- und Langzeitergebnissen.

Die Hamburger Hornhautbank (Hamburger Eye Bank (HEB)), eine der ältesten Hornhautbanken Deutschlands, wurde im Jahre 1981 gegründet. Auf eine genaue Dokumentation mit Protokollierung verschiedener Charakteristika zur Qualitätskontrolle wurde von Beginn an großer Wert gelegt. Die Hornhautendothelzellichte des Spenders wird weltweit als eines der Hauptkriterien für die Qualitätsbestimmung verwendet und beeinflusst die Transplantationsstabilität langfristig. Weitere Kriterien zur Transplantationsfreigabe einer Spenderhornhaut sind Sterilität, ein narbenfreies Transplantat und negative serologische Tests des Spenders für Hepatitis B und C, HIV und Syphilis.

Entnahmetechnik oder Kultivierungsmethodik haben einen Einfluss auf die Qualität des Transplantates. Spender-Hornhäute, die diese Voraussetzungen nicht erfüllen, werden verworfen.

Das Ziel dieser retrospektiven deskriptiven Publikation ist einen Überblick über die Entwicklung der HEB zu geben, sowie relevante demografische Daten der Spender und der Prozessparameter über einen langen Zeitraum zu beschreiben

Material und Methodik

Material und Methodik

Seit der Gründung der HEB im Jahre 1981 wurden die Verfahren für die Gewebeentnahmen und Konservierung bzw. Kultivierung nach der jeweiligen aktuellen Studien- und Gesetzeslage mehrmals angepasst. Bis 1985 wurden die Spenderaugäpfel in einer feuchten Kammer für maximal 4 Tage aufbewahrt. Diese zum Teil noch in anderen Ländern durchgeführte Methodik wurde 1986 durch die Organkultur der Spenderhornhäute komplett abgelöst (Bohnke 1991a, b). Bei dieser Technik kann ein korneoskleraler Ring, welcher innerhalb von 24 Stunden unter sterilen Bedingungen im Labor aus dem explantierten Spenderbulbus präpariert wurde, bis zu 4 Wochen mit regelmäßigen Analysen der Endothelzelldichte kultiviert und vital gehalten werden. In dieser Zeitspanne ist eine genauere serologische und mikrobielle Untersuchung möglich. Die HEB verwendet eine Kulturtemperatur von 37 °C, um frühzeitig ein evtl. mikrobiologisches Wachstum zu detektieren. 2008 wurde ebenfalls die Entnahmemethodik der Enukleation des Auges geändert. Nach einer einjährigen Einführung wird heutzutage standardmäßig nur die korneosklerale Scheibe aus der Leiche herauspräpariert und anschließend in einem Kulturmedium in die Hornhautbank zur weiteren Bearbeitung transportiert. Diese Methode ist weniger invasiv für den Spender, erfordert jedoch besondere Sorgfalt der explantierenden Person, um eine Kontamination oder Beschädigung des Gewebes zu vermeiden. Alle Explantationen erfolgten im Einverständnis der Angehörigen der Spender nach deutschem Gesetz und die in der Studie verwendeten diversen Spenderdaten wurden nach Gesetzeslage und der Deklaration von Helsinki erhoben. Alle Daten wurden zu Beginn auf Papier dokumentiert und im Verlauf elektronisch übertragen. 1989 erfolgte eine komplette Konvertierung in eine Microsoft Access Datei, die nun alle Daten von 1981 bis heute beinhaltet.

In dieser Studie wurde primär deskriptive Statistik für die Berechnung von medianen und interquartilen Werten verwendet. Für die explorative Statistik wurde der Mann-Whitney-U-Test und Chi-Quadrat-Test benutzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die „Hamburg Eye Bank-Databank“ (HEB-DB) erhob wertvolle Informationen im Zeitraum 1981 bis einschließlich Juni 2010 von 5503 Spendern und 10 943 Spenderhornhäuten, von denen 4759 transplantiert wurden.

In Tabelle 1 werden die gesamten primären und sekundären Parameter, die in der Datenbank über fast 30 Jahre erfasst wurden, aufgeführt. Anhand dieser Daten konnten die jährlichen Entwicklungen der Spenderzahlen, Transplantationsraten, Spendenalter, Spendergeschlechts, Kulturzeiten, Endothelzellzahlen, Kontaminationsraten und Zeitintervalle zwischen der Entnahme des Gewebes und Kultur (DEI) berechnet werden. Desweiteren beinhaltet die Datenbank die Todesursachen der Spender mit Geschlechteraufteilung.

Das durchschnittliche Alter aller Spender lag im Mittel bei 62 Jahren und zeigte eine vergleichbare Altersverteilung mit schon publizierten Ergebnissen aus anderen Hornhautbanken (Patel et al. 2005). Die Transplantationsrate korrelierte erwartungsgemäß mit der kornealen Endothelzahl bei der ersten mikroskopischen Messung nach Explantation (Tabelle 2), sowie mit dem Spenderalter. In der Literatur (Blatt et al. 1979; Carlson et al. 1988; Bourne et al. 1997; Rao et al. 2000; Hashemian et al. 2006; Yunliang et al. 2007; Laule et al. 1978; Culbertson et al. 1982; Yee et al. 1985; Mattern et al. 1995; Probst et al. 1997; Gavrillov et al. 2010;) wird ein Endothelzellzahlverlust von 0,3% bis 0,6% pro Lebensjahr und ein Anstieg des Polymegathismus und Pleomorphismus beschrieben. Ursache sind altersbedingte physiologische Veränderungen. Ein anderer Grund für einen erhöhten endothelialen Zellverlust bei älteren Patienten wird dem höheren Anteil von voroperierten pseudophaken Augen zugeschrieben, da intraoperativ oft eine mechanische Schädigung der Hornhautzellen erfolgt. (Probst et al. 1997). Unsere Berechnungen zeigen ebenso einen ähnlichen altersabhängigen Endothelzellverlust (Abb. 2) in Höhe von 0,3% pro Lebensjahr und 84,2 Endothelzellen/mm²/Lebensdekade (Pearson-Korrelation -0,341, p <0,001) bei einem Mittelwert von 2500 Zellen/mm². Einzelne Altersgruppen wurden in Abb. 3 in

Bezug auf ihre Transplantationsrate aufgestellt und zeigten auch hier eine verminderte Transplantierbarkeit im erhöhten Alter. Dennoch hatten auch Spender über 80 Jahre noch in 31,2% der Fälle eine ausreichende Hornhautqualität für eine Transplantation. Andere Hornhautbanken veröffentlichten vergleichbare Ergebnisse. [23% mit Spenderalter von 70 Jahren (Moyes et al. 1995), 45% mit Spenderalter von 75 Jahren (Armitage & Easty 1997), 53% mit Spenderalter von 80 Jahren (Gain et al. 2002)]. Bei persistierendem Spendermangel empfehlen wir, wie Gain, (Gain et al. 2002) auch die älteste Altersgruppe der über 80-jährigen als potentielle Spender zuzulassen und einen Versuch der Hornhautkultur. Eine weitere interessante Beobachtung ist die scheinbare negative Korrelation (Pearson-Korrelation = -0,077) zwischen der Endothelzellzahl und der DEI, welche über die Jahre stetig verlängerte (von durchschnittlich 16 h (1981-1985) auf durchschnittlich 38 h (seit 1996)). Darüber hinaus besteht auch eine positive Korrelation (Pearson-Korrelation = 0,143, $p < 0,001$) zwischen DEI und dem Spenderalter. Unter Berücksichtigung der schon oben dargelegten Wechselbeziehungen von Alter und Endothelzellzahl, führen wir die Verringerung der Endothelzellzahlen bei steigendem DEI eher auf den parallelen Altersanstieg zurück.

Die demographische Untersuchung der Spender in Bezug auf Geschlecht ergab vergleichbar mit der Literatur (Patel et al. 2005) einen signifikant erhöhten Männeranteil von 64,8%, sowie ein geringeres Spender-Durchschnittsalter bei Männern von 60 Jahren, was sich in der statisch verminderten Lebenserwartung widerspiegelt. Es zeigte sich eine vergleichbare Verteilung der Geschlechter in allen Todesursachen mit Ausnahme von penetrierenden Verletzungen (Schuß- und Messerverletzung) und Stromunfällen (Abb.3), bei denen Männer einen deutlich höheren Anteil haben. Unerwartet war jedoch, dass weiblichen Spender ähnliche Zahlen über traumatische und kardiovaskuläre Todesursachen aufwiesen, obwohl nach allgemeiner Statistik hauptsächlich Männer betroffen ist. Wir führen dies auf eine Verzerrung in der Selektion der Spender-Rekrutierung zurück, da man eher versucht junges Spendergewebe zu erhalten. Umfassendere Untersuchungen über den Einfluss der Todesursachen und Grunderkrankung auf wichtige Hornhaut Qualitätsmerkmale wie z.B. Endothelzellzahl, Endothelzellverlust in Kultur sind geplant.

Im Jahre 1985 wurde in der HEB die Organkultur eingeführt, wodurch die Aufbewahrung der Hornhaut von vorher maximal 7-10 Tagen auf bis zu 23 Tagen

verlängert werden konnte (Abb. 1B). Dies ermöglichte bessere und genauere präoperative mikrobiologische und serologische Untersuchungen und verhindert somit schwere postoperative Komplikationen. Szaflik (Szaflik et al. 2000) beobachtete jedoch, dass man durch eine verkürzte Aufbewahrung, wie z.B. bei der kostengünstigeren Hypothermie, ein besseres Ergebnis in Bezug auf Endothelzellzahl und Hornhautschwellung erreicht. Andere Studien hingegen veröffentlichten stabile Transplantatbefunde in der Endothelzellzahl, der Morphologien und den Hornhautdicken über 35 Tage in Organkultur (Doughman 1980; Lindstrom et al 1992;.. Probst et al 1997). Auch postoperativ sei der Transplantatbefund aus Organkultur konstant (Ehlers 2002). Unsere Analysen hingegen zeigten einen leichten wöchentlichen Endothelzellverlust von 5,7% in Hornhautkulturen (Abb. 1C) . In Hochrechnungen wurde bei einer durchschnittlichen Kulturdauer von 23 Tagen ein Zellzahlverlust von 17,5% kalkuliert.

Eine zwar seltene aber schwere Komplikation nach Keratoplastik ist eine Transplantat-Keratitis, die unter der lokalen und systemischen Immunsuppression leicht in eine Endophthalmitis übergehen kann. Daher ist eine gründliche postoperative mikrobielle Untersuchung vor, während und nach Kultur der Spenderhornhäute indiziert. In der Literatur werden variable Kontaminationsraten von 4-37% in Hypothermie (Pardos & Gallagher 1982;.. Kloess et al 1993; Reed et al 1994;.. Gomes et al 1995) und 0,6-16% für Organkultur (Erbezci et al 1995;.. Hagenah et al 1995;.. Builles et al 2006;.. Fontana et al 2007;.. Hermel et al 2010) angegeben. Unsere Datenlage zeigte eine mittlere Kontaminationsrate von 5,3% über den gesamten Zeitraum. Auffallend ist ein deutlicher Anstieg der Kontaminationsraten von 2006 bis 2008 auf bis zu 19,4% der Kulturen (Abb.4). Dies kann man im Zusammenhang mit der Einführung der potentiell kontaminationsreicheren in situ Entnahmetechnik gesehen werden. Durch eine optimierte Desinfektion und Entnahmetechnik, sowie intensiven Schulungen der entnehmenden Mitarbeiter sank die Kulturverunreinigung rapide auf die aktuelle Rate von 10,3%.

Insgesamt wurden 43,5% der Hornhäute in der HEB zur Transplantation freigegeben, womit die Rate leicht unter anderen publizierten Daten liegt: Das Autorenteam um Williams (Williams and alt1990) veröffentlichte eine Transplantationsrate von 55%, wobei auch Hornhäute mit geringeren Endothelzahlen zwischen 1500 und 2000 Zellen/mm² zur Operation zugelassen wurden. Die New Zealand National Eye Bank

Study (Patel et al. 2005) veröffentlichte sogar eine Transplantationsrate von 79,1%, welche wir in einigen Jahren annähernd aufzeigen können. Genauere zeitliche Analysen der Daten zeigte nach Gründung der Hornhautbank ein stetig aufsteigendes Transplantationsverhältnis mit einem Höhepunkt im Jahr 1989 mit 68% und 2007 mit 75% (Abb. 1A). Hervorzuheben ist der Zeitraum zwischen 1988 und 2007 mit einer Zunahme an kultivierten Hornhäuten jedoch mit einer geringen Transplantatrate. Die absolute Zahl der für die Transplantation verwendeten Hornhäute hingegen verblieb jedoch konstant mit stabiler endothelialer Integrität und Endothelzellzahlverlust pro Woche (Abb. 1A-C). Eine Ursache für die verminderte Transplantationsrate in diesem Zeitraum sehen wir nicht in möglichen Problemen der routinemäßigen Kultivierung, sondern eher in den Änderungen der rechtlichen Bestimmungen, der Struktur der Spender Rekrutierungen und der Transplantationsaktivität der Klinik. Im Jahre 2003 kam es jedoch zu einem Zunahme der Transplantatrate, bei gleichzeitig fallenden absoluten Zahlen von Spenderhornhäuten und verlängerter Kulturdauer. Dies muss man in Beziehung zu den frühzeitig eingeführten EU-Richtlinien von 2004 und 2006 über verschärfte Qualitäts- und Sicherheitsstandards für Spender, Rekrutierung, mikrobiologischen Untersuchungen, Verarbeitung, Kultur und Verteilung sehen. (Richtlinie 2004/23/EG). (2006/17/EG und 2006/86/EG) gesehen werden. Dadurch scheinen zwar weniger, aber qualitativ bessere Hornhäute rekrutiert worden zu sein. Um jedoch einen Einbruch in der absoluten Spenderzahl zu verhindern, hob die Hamburger Hornhautbank die Altersbeschränkung für Hornhautspende auf. Trotz dieser Maßnahme konnte ein Rückgang der Spenderhornhäute nicht vermieden werden. Auch der Wechsel der Explantationsmethode zur korneoskeralen Entnahme in den Jahren 2007 bis 2008 verursachte einen Abfall von transplantierbaren Hornhäuten durch die, wie bereits diskutierten, erhöhten Kontaminationsraten. Durch die oben genannte Optimierung der Methodik konnte man im Jahre 2009 kaum einen Unterschied mehr zwischen der Methodik in Bezug auf die Gesamtanzahl und transplantierten Spenderhornhäute feststellen.

In dieser Publikation wurden Daten von mehr als 10 000 Hornhäute, die über fast 30 Jahre gesammelt wurden, analysiert. Nach unseren Informationen gibt es keine vergleichbare Studie in dieser Größe. Allerdings enthält unsere Untersuchung leider keine postoperativen klinischen Ergebnisse und Verläufe.

Sie bietet jedoch umfassende Informationen zu vielen bereits untersuchten bzw neuen Aspekten der Hornhautbank. Wir konnten verschiedene Trends und Veränderungen sowie Zusammenhänge mit Spender Demographie, Verarbeitung, Kultivierung und Kontamination und Nutzung aufzeigen.

So wurden aufbauend auf die immense Datenmenge eine Studie über die Kontamination in der Hamburger Hornhautbank (Linke et al 2012) kürzlich bei Cornea akzeptiert, welche neue Erkenntnisse über die Kontaminationsfaktoren erbracht . Weitere laufende Analysen befassen sich genauer mit dem Wechsel der Explantationsmethode, dem Einfluss der Todesursache und Grunderkrankung von Spendern und dem Einfluss der gesetzlichen Änderungen auf die Hornhaut Spende Bereitschaft.

Durch diese Ergebnisse können sowohl die Hamburger Hornhautbank als auch andere Hornhautbanken ihre Prozesse optimieren und somit Hornhäute mit verbesserter Sicherheit, Effizienz bereitstellen. Dies würde sich positiv auf den postoperativen Verlauf auswirken und ggf. ein frühzeitiges Transplantatversagen verhindern. Desweitem könnten die Erkenntnisse aus der Datenbank helfen, bei bekannten Spendereigenschaften schon vor der Explantation Prognosen über die Hornhaut Qualität, den Kulturverlauf und dem postoperativen Verlauf anzugeben und dann ggf. Spendegewebe nach Potential zu selektieren.

Literaturangaben

- Armitage WJ & DL Easty** (1997): Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 16-24.
- Bohnke M** (1991): CORNEAL PRESERVATION IN ORGAN-CULTURE. *Current Opinion in Ophthalmology* 2: 432-442.
- Bohnke M** (1991): [Donor tissue for keratoplasty. Report of experiences by the Hamburg cornea bank]. *Klin Monbl Augenheilkd* 198: 562-571.
- Boisjoly HM, R Tourigny, R Bazin, PA Laughrea, I Dube, G Chamberland, J Bernier & R Roy** (1993): Risk factors of corneal graft failure. *Ophthalmology* 100: 1728-1735.
- Bourne WM** (1983): Morphologic and functional evaluation of the endothelium of transplanted human corneas. *Trans Am Ophthalmol Soc* 81: 403-450.
- Builles N, M Perraud, ME Reverdy, C Burillon, P Crova, F Brun, F Chapuis & O Damour** (2006): Reducing contamination when removing and storing corneas: a multidisciplinary, transversal, and environmental approach. *Cornea* 25: 185-192.
- Bundesamt S** (Oktober 25, 2010.): Todesursachenstatistik Book Todesursachenstatistik. City.
- Carlson KH, WM Bourne, JW McLaren & RF Brubaker** (1988): Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res* 47: 27-41.
- Chu W** (2000): The past twenty-five years in eye banking. *Cornea* 19: 754-765.
- Culbertson WW, RL Abbott & RK Forster** (1982): Endothelial cell loss in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 89: 600-604.
- Dandona L, TJ Naduvilath, M Janarthanan, K Ragu & GN Rao** (1997): Survival analysis and visual outcome in a large series of corneal transplants in India. *Br J Ophthalmol* 81: 726-731.
- Doughman DJ** (1980): Prolonged donor cornea preservation in organ culture: long-term clinical evaluation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 78: 567-628.
- Ehlers N** (2002): Corneal banking and grafting: the background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. *Acta Ophthalmol Scand* 80: 572-578.
- Erbezci M, PH Monnot, Y Michel-Briand, M Masse & B Delbosc** (1995): [Organ culture preservation of the human cornea at +31 degrees C and risk of infection]. *J Fr Ophtalmol* 18: 106-113.
- Filatov VP** (1935): Transplantation of the cornea. *Arch Ophthalmol* 13: 321-347.
- Fontana L, PG Errani, A Zerbinati, Y Musacchi, B Di Pede & G Tassinari** (2007): Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea* 26: 552-556.
- Forster RK & M Fine** (1971): Relation of donor age to success in penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 85: 42-47.

Gain P, G Thuret, C Chiquet, P Rizzi, JL Pugniet, S Acquart, JJ Colpart, JC Le Petit & J Maugery (2002): Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol* 86: 404-411.

Gavrilov JC, VM Borderie, L Laroche & B Delbosc (2010): Influencing factors on the suitability of organ-cultured corneas. *Eye (Lond)* 24: 1227-1233.

Gomes JA, MR Dana, HS Dua, MB Goren, PR Laibson & EJ Cohen (1995): Positive donor rim culture in penetrating keratoplasty. *Cornea* 14: 457-462.

Hagenah M, M Bohnke, K Engelmann & R Winter (1995): Incidence of bacterial and fungal contamination of donor corneas preserved by organ culture. *Cornea* 14: 423-426.

Hashemian MN, S Moghimi, MA Fard, MR Fallah & MR Mansouri (2006): Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmol* 6: 9.

Hermel M, S Salla, N Hamsley, A Steinfeld & P Walter (2010): Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248: 117-126.

Jenkins MS, SL Lempert & SI Brown (1979): Significance of donor age in penetrating keratoplasty. *Ann Ophthalmol* 11: 974-976.

Kloess PM, RD Stulting, GO Waring, 3rd & LA Wilson (1993): Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 115: 309-316.

Lindstrom RL, HE Kaufman, DL Skelnik, RA Laing, JH Lass, DC Musch, MD Trousdale, WJ Reinhart, TE Burris, A Sugar & et al. (1992): Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 114: 345-356.

Mattern RM, EL Heck & HD Cavanagh (1995): The impact on tissue utilization of screening donor corneas by specular microscopy at the University of Texas Southwestern Medical Center. *Cornea* 14: 562-567.

Moyes AL, EJ Holland, FE Palmon, JA Dvorak & DJ Doughman (1995): Tissue utilization at the Minnesota Lions' Eye Bank. *Cornea* 14: 571-577.

Naydis I, M Klemm, A Hassenstein, G Richard, T Katz & SJ Linke (2011): [Postkeratoplasty astigmatism : Comparison of three suturing techniques.]. *Ophthalmologie* 108: 252-259.

Pardos GJ & MA Gallagher (1982): Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. *Arch Ophthalmol* 100: 1611-1613.

Patel HY, NH Brookes, L Moffatt, T Sherwin, S Ormonde, GM Clover & CN McGhee (2005): The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea* 24: 576-582.

Probst LE, BA Halfaker & EJ Holland (1997): Quality of corneal donor tissue in the greater-than-75-year age group. *Cornea* 16: 507-511.

Rao SK, P Ranjan Sen, R Fogla, S Gangadharan, P Padmanabhan & SS Badrinath (2000): Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea* 19: 820-823.

Reed JW, LA Bealer, CM Sloop & RM Davis (1994): Questionable Benefit of Cultures At the Time of Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 13: 101.

Schroeter J, P Maier, J Bednarz, K Bluthner, M Quenzel, A Pruss & T Reinhard (2009): [Procedural guidelines. Good tissue practice for cornea banks]. *Ophthalmologe* 106: 265-274, 276.

Seitz B, A Langenbucher & GO Naumann (2005): [The penetrating keratoplasty. A 100-year success story]. *Ophthalmologe* 102: 1128-1136, 1138-1129.

Szaflik J, I Liberek & M Brix (2000): Corneal storage methods. *Transplant Proc* 32: 1424-1425.

Tullo AB & PA Dyer (1995): Corneal transplantation in Britain. *BMJ* 310: 1347-1348.

Williams KA, SM Muehlberg, RF Lewis & DJ Coster (1997): Influence of advanced recipient and donor age on the outcome of corneal transplantation. Australian Corneal Graft Registry. *Br J Ophthalmol* 81: 835-839.

Williams KA, MA White, PR Badenoch, TR Wedding, SJ Alfrich, MA Sawyer, LM Noack, EW Johnstone, G Zilm & DJ Coster (1990): Donor cornea procurement: six-year review of the role of the eye bank in South Australia. *Aust N Z J Ophthalmol* 18: 77-89.

Yee RW, M Matsuda, RO Schultz & HF Edelhauser (1985): Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 4: 671-678.

Yunliang S, H Yuqiang, L Ying-Peng, Z Ming-Zhi, DS Lam & SK Rao (2007): Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Chinese eyes. *Cornea* 26: 130-132.

Thirty years of cornea cultivation: long-term experience in a single eye bank

Stephan J. Linke,^{1*} Mau-Thek Eddy,^{1*} Jürgen Bednarz,²
Otto H. Fricke,¹ Birgit Wulff,³ Ann-Sophie Schröder,³
Andrea Hassenstein,¹ Maren Klemm,¹ Klaus Püschel,³
Gisbert Richard¹ and Olaf J. C. Hellwinkel³

¹Department of Ophthalmology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²t2cure GmbH, Frankfurt a. M., Germany

³Department of Forensic Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ABSTRACT.

Purpose: To evaluate donor demographics, trends in donor tissue procurement and tissue storage over a long period.

Methods: A retrospective, longitudinal, descriptive analysis was undertaken of data from the Hamburg Eye Bank Data Base (HEB-DB) that had been collected between 1981 and 2010. Data on 54 parameters of cornea donors [including clinical history, age, death cause, gender and death-to-explantation interval (DEI)] and of cultivated corneas (endothelial quality and development in culture, cultivation period, microbiological contamination) were retrieved. These data were analysed statistically, focusing on the historical development of the eye bank.

Results: At the time of retrieval (June 2010), the HEB-DB contained data on 10 943 corneas (5503 donors). Most donors were men (65%) and had died from cardiopulmonary ($n = 801$)/cerebral ($n = 261$) failure or as the result of a polytraumatic accident/suicide ($n = 602$). Within these years, donor age, DEI and storage time increased. The percentage of stored corneas suitable for transplantation displayed a variable but increasing trend; in 2007, almost 75% of the stored corneas were transplanted. Between 1995 and June 2010, the median microbiological contamination rate was 5.3%. A change in the procurement procedure from enucleation to corneoscleral explantation in 2008 led to a briefly increased contamination rate.

Conclusion: Donor demographic data run parallel to the general demographic development. Our analysis indicates a dynamic development of the eye bank over the last 30 years and emphasizes the need for an active quality management in coping with the challenges of modern eye banking.

Key words: cornea – donor tissue – eye banking, database – transplantation

Acta Ophthalmol.

© 2012 The Authors

Acta Ophthalmologica © 2012 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation

doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02471.x

*Both authors contributed equally to this work.

Introduction

In 1905, the first successful penetrating keratoplasty was performed, initiating a new chapter in restoring the sight of patients with corneal blindness. Today, cornea transplantation is a standard clinical procedure with a high rate of success (Naydis et al. 2011) and keratoplasty is the most frequently performed transplant procedure worldwide (Seitz et al. 2005). The high demand for corneal tissue is covered by the network of eye banks, which organizes the donation, procurement, testing, processing, preservation and distribution of corneal tissue for transplantation.

The idea of modern eye banking was published by Filatov in 1935 (Filatov 1935). In parallel, efforts were made in the United States, and the first eye bank was founded in New York in 1944. Since its foundation, the methods for corneal donor preservation have been continuously improved. Hence, high standards in corneal quality and safety, and consequently a better surgical outcome and transplant stability, have been achieved. Since the start of eye banking at the Hamburg Eye Bank (HEB) in 1981, a standard protocol has been used to collect valuable information

that might be associated with the quality of the tissue.

The main criterion for the quality of a donor cornea is the cell density of its endothelium. To meet the specification of a donor cornea for transplantation, a cell density of 2000 cells/mm² is required, and this density is used as the cut-off in many eye banks. However, because this is not a generally accepted standard, it can differ from eye bank to eye bank. The specification further includes sterility, absence of scars and negative serological testing of the donor for hepatitis B and C, HIV and syphilis. The reasons for a donor cornea not meeting the specification for a cornea transplant may be related to donor characteristics or to events during the procurement and storage of the tissue.

The aim of this study was to provide an overview on the development of the HEB and to describe donor demographic data and process-related parameters over a long-time interval.

Materials and Methods

Tissue procurement and preservation

Since the foundation of the HEB in 1981, the procedures for tissue procurement and preservation have changed several times. At first, the whole donor globe was explanted and stored at 4°C in a moist chamber until transplantation of the cornea. The main limitations of this method were the short storage time of about 4 days and the technical difficulties of evaluating the corneal endothelium. In 1985, long-term culture (also known as organ culture) of donor corneas was introduced at the HEB, and since 1986, it has been the standard procedure (Bohnke 1991a,b). Initially, the whole donor globe was explanted, and the corneoscleral disc was excised within 24 hr under laboratory conditions. The cornea was transferred to a culture flask containing tissue preservation medium and stored at 37°C. This method increased the storage time for the donor corneas to 4 weeks and enabled microscopic analysis of the donor cornea during preservation. We applied an ambient temperature of 37°C, that is, the upper limit of the temperature range (30–37°C) proposed by current cornea cultivation guidelines (Schroeter et al. 2009). We chose

this temperature as it would favour microbiological growth, thus allowing early detection of microbiological activity. Excision of the corneoscleral button rather than enucleation was introduced in 2007 and became the standard procedure for corneal tissue procurement at the HEB in 2008. This method is less invasive for the donor but requires special diligence on the part of the eye bank personnel to avoid contamination or damage of the tissue.

Data acquisition

All data were documented after receiving informed consent of the relatives of the cornea donors according to German legislation. The authors confirm that the study and data accumulation conformed with all federal or state laws and that the study was in adherence to the tenets of the Declaration of Helsinki.

At the HEB, the data for cornea donors and cornea cultivation parameters have been recorded in paper documents and (additionally) in electronic files. In 1998, the electronic files were converted into the current Access database (Microsoft).

Statistics

Descriptive statistics comprised mainly medians and interquartiles (in case of Gaussian distribution patterns: means and standard deviations). For explorative statistics, Mann–Whitney *U*-test and chi-square tests were applied.

Results

HEB-DB structure

Detailed information on the HEB-DB structure is given in Table 1 and includes documented (primary) parameters, deduced (secondary) parameters, the numbers of analysable data (*n*) and the type of the variables (ordinal, numeric or categorical). The database contains data on 5503 donors and 10 943 corneas that have cultivated between 1981 and June 2010.

HEB history

Cornea cultivation and transplantation activities over the last 30 years

achieved their maximum in 1999 with 727 cultivated corneas and in 2003 with 240 transplanted corneas, respectively, as outlined in Fig. 1A. Overall, 4759 of the cultured corneas (43.5%) were transplanted. The yearly utilization rate of corneas, that is, the number of transplanted donor corneas compared with that of cultured corneas, varied irregularly with two maxima in 1989 (68%) and 2007 (75%), and a minimum in 1999 (30.5%). As shown in Fig. 1B, the median donor age was ~53 years between 1981 and 1989, after which it increased slightly, reaching ~65 years by 1996. The median endothelial cell count determined at preparation remained relatively stable at 2600 cells/mm², with slightly higher values found between 1986 and 1992 (Fig. 1B). The median death-to-(cornea)-explantation interval (DEI) increased continuously from ~16 hr (between 1981 and 1985) to ~38 hr (since 1996) (Fig. 1B). The cultivation period displays the most striking development. While short-time hypothermic storage of the whole globe was predominant in the first years, from 1981 to 1985, the introduction of organ culture storage in 1985 led to increased cultivation periods, reaching the highest median value of approximately 23 days in 1995 and 2009 (Fig. 1B).

A rather constant value of about 5.7% was found for the median weekly decrease in the endothelial cell density (ECD) during culture (Fig. 1C).

Cornea quality and cornea transplantation

As shown in Table 2, transplantation suitability was strongly dependent on the initial ECD at the time of preservation. The ECD decreased with advancing donor age by 84.2 endothelial cells/mm² per decade (this approximates to 0.3% per year), assuming a linear correlation (Fig. 2). This is reflected by the decrease of suitable cornea transplants with increasing donor age. However, 31.2% of the corneas of the oldest age group were still eligible for transplantation (Table 3).

Increasing DEIs are weakly but significantly associated with lower endothelial cell counts (Pearson's correlation = -0.077; *p* < 0.001). At the

Table 1. Principle structure of the Hamburg Eye Bank Data Base.

Parameter	Type of parameter	Analysable cases	Type of variable
ID	Primary parameters	10 943	ID-code
Year	Primary parameters	10 786	Ordinal
Side (r/l)	Primary parameters	10 920	Categories
Explantation method	Primary parameters	9231	Categories
Explantation place	Primary parameters	3718	Categories
Donor age	Primary parameters	10 851	Numeric
<i>Donor age group</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>10 851</i>	Categories
Donor gender	Primary parameters	10 732	Categories
Donor death cause (text)	Primary parameters	10 455	Uncodified text
<i>Donor death cause (category)</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>4481</i>	Categories
basal diseases (text)	Primary parameters	3832	Uncodified text
<i>Basal diseases (category)</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>717</i>	Categories
Systemic infections	Primary parameters	1550	Categories
Diagnosed tumour in donor	Primary parameters	1885	Categories
Bulbus explantation (hours post-mortem)	Primary parameters	8874	Numeric
Slit lamp results	Primary parameters	8734	Categories
Epithelial state	Primary parameters	7354	Categories
Cornea explantation (hours post-mortem)	Primary parameters	10 132	Numeric
Endothelial density	Primary parameters	9889	Numeric
<i>Endothelial density (categories)</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>9889</i>	Categories
Blood group	Primary parameters	729	Categories
Rhesus factor	Primary parameters	729	Categories
HLA_A_1	Primary parameters	compiled numbers see secondary parameter below (immuno-typed)	Categories
HLA_A_2	Primary parameters		
HLA_A_3	Primary parameters		
HLA_A_4	Primary parameters		
HLA_B_1	Primary parameters		
HLA_B_2	Primary parameters		
HLA_B_3	Primary parameters		
HLA_B_4	Primary parameters		
HLA_C_1	Primary parameters		
HLA_C_2	Primary parameters		
HLA_DR_1	Primary parameters		
HLA_DR_2	Primary parameters		
HLA_DR_3	Primary parameters		
HLA_DR_4	Primary parameters		
HLA_DQ_1	Primary parameters		
HLA_DQ_2	Primary parameters		
<i>Immuno-typed</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>970</i>	Categories
Result Hepatitis B serology	Primary parameters	9082	Categories
Result HIV serology	Primary parameters	7031	Categories
Result Hepatitis C serology	Primary parameters	7252	Categories
<i>Complete serology (pos./neg.)</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>6982</i>	Categories
Documented media sterility	Primary parameters	8997	Ordinal
<i>Sterile?</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>8999</i>	Categories
Interval till last deswelling (days)	Primary parameters	6000	Numeric
Interval post-mortem till transplantation (days)	Primary parameters	6476	Numeric
How often deswelled	Primary parameters	6541	Ordinal
Interval in dextran containing media	Primary parameters	6413	Numeric
Preoperative assessment	Primary parameters	8082	Categories
Preoperative endothelial density	Primary parameters	7951	Numeric
<i>Endothelial cell loss (absolute) over all</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>7485</i>	Numeric (continuous)
<i>Endothelial cell Loss (absolute) per week</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>4608</i>	Numeric (continuous)
<i>Endothelial cell loss (per cent) per week</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>4595</i>	Numeric (continuous)
Usage of cornea	Primary parameters	9854	Categories
<i>Transplanted?</i>	<i>Secondary parameters</i>	<i>9853</i>	Categories
Transplantation centre	Primary parameters	1897	Categories
Assessment at immersion in media	Primary parameters	9308	Categories
Assessment at immersion in BSS	Primary parameters	5739	Categories
Spontaneous visibility of cell nuclei in media	Primary parameters	8502	Categories
Spontaneous visibility of cell borders in media	Primary parameters	7654	Categories
Swollen cell borders in BSS	Primary parameters	6039	Categories
Necrotic events	Primary parameters	7269	Categories
Spontaneous impression in media	Primary parameters	7978	Categories
Swelling of intercellular borders in BSS	Primary parameters	6992	Categories
Summary (over recollected data from 1981 to June 2010)			
Number of corneas	10 943		
Number of donors	5503		
Transplanted corneas	4759		
Primary parameters	54		
(Thereof parameters on Immuno-typing)	(16)		

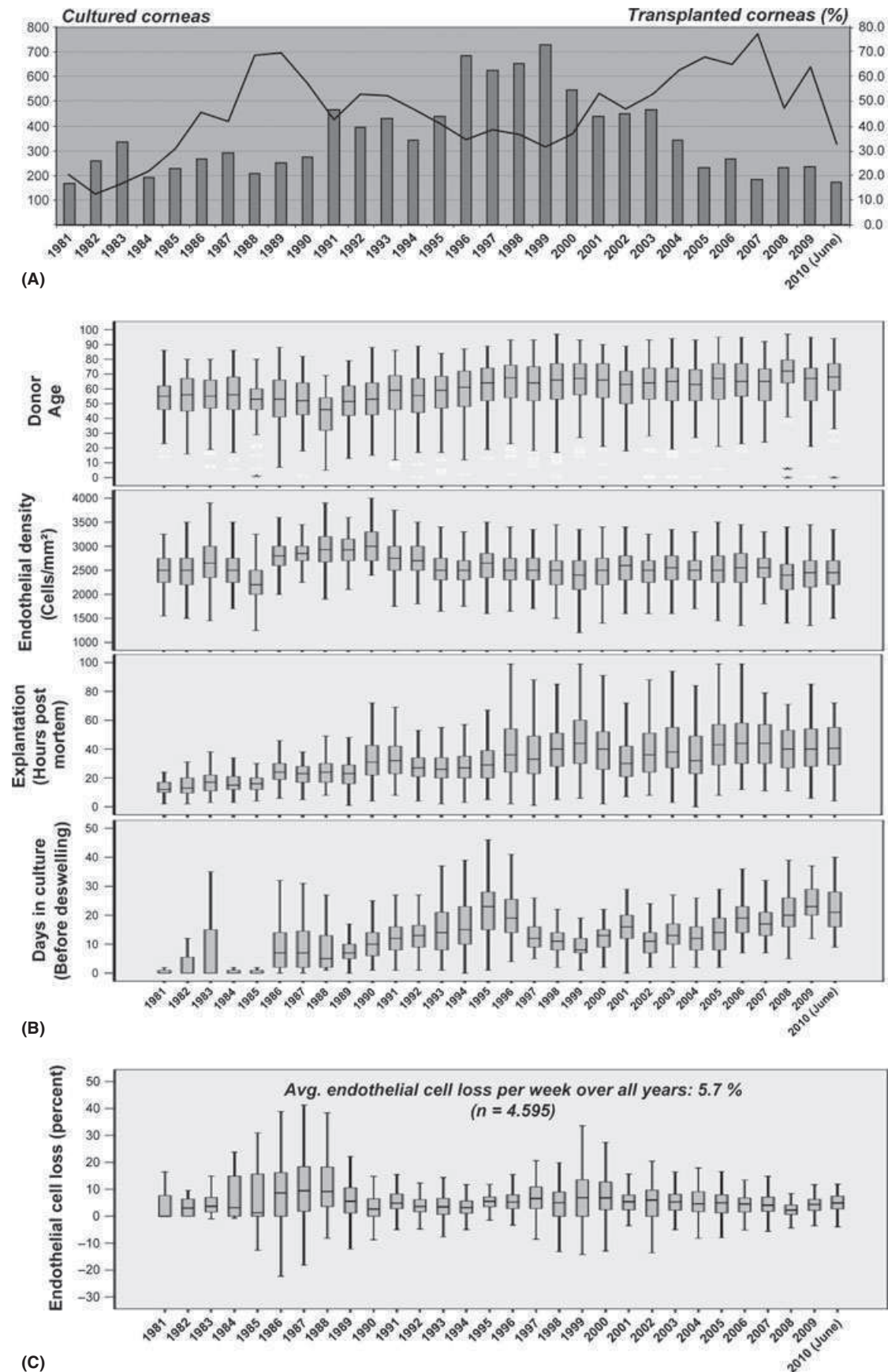


Fig. 1. Historical development of the HEB from 1981 to June 2010. (A). Columns: yearly numbers of cultured corneas; Line: yearly numbers of transplanted corneas (per cent). (B). Development of donor and cultivation parameters (donor ages; endothelial densities and post-mortem intervals at explantation; days in culture) over the years. (C) Development of yearly endothelial cell losses per week (per cent).

Table 2. Share of transplanted corneas according to the endothelia quality.

Endothelia Quality (group)	Corneas (n)	Transplanted? (%)		p (χ^2 test)
		Yes	No	
Good (>2600 cells/mm ²)	4089	58.8	41.2	> 0.001
Acceptable (2200–2600 cells/mm ²)	3583	48.7	51.3	
Borderline (2000–2200 cells/mm ²)	850	34.2	65.8	
Poor (<2000 cells/mm ²)	469	18.3	81.7	

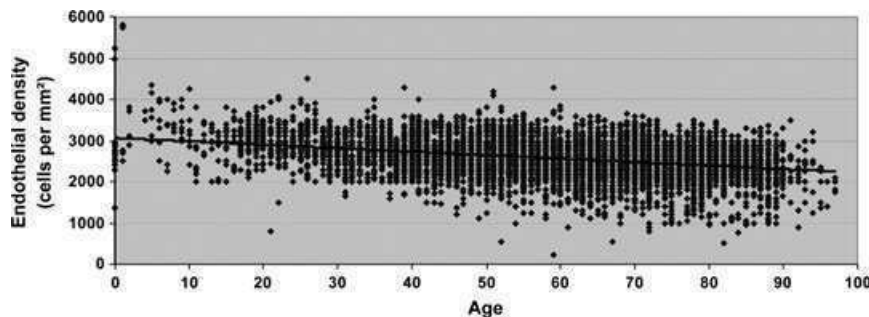


Fig. 2. Correlation between the donor age and the initial endothelial density.

Table 3. Share of transplanted corneas according to the donor age.

Donor age [group]	Corneas (n)	Transplanted? (%)		p (χ^2 test)
		Yes	No	
<20 years	243	63.4	36.6	> 0.001
20–39 years	944	59.6	40.4	
40–59 years	3204	54.2	45.8	
60–79 years	4332	45.3	54.7	
≥80 years	1063	31.2	68.8	

same time, the DEI also correlates with donor age (Pearson's correlation between DEI and age = 0.143; $p < 0.001$).

Donor demographics and influence of the cause of death on the release of the donor cornea for transplantation

As shown in Fig. 3, the three main causes of death of the donors were cardiopulmonary failure, polytraumatic accidents or suicides and cerebral causes. The median age at death was 62 years (interquartile range 49–72.5), although this displayed a rather non-parametric distribution pattern (Fig. 1). The majority of donors were men (64.8%). The male donors had a statistically significantly lower median age of death (60 years, interquartile range 48–70) than female donors (65 years, interquartile range 52–76). However, the distribution pattern of

the death causes was comparable for both genders (Fig. 3), for example, of donors dying from cardiovascular failure, 35.8% were women and 37.1% were men; of those dying from polytraumatic accident or suicide, 25.2% women and 29% were men. In contrast, a higher percentage of the female donors had died because of cerebral disorders (17.5% compared with 9.1% for men), whereas a higher percentage of male donors died from penetrative force (by gunfire or blades; 2.5% male versus 0.1% female donors) or electrocution.

Contamination

From the beginning in 1981, the storage medium for the corneas was screened for microbiological contamination. From 1995 to 2010, the HEB recorded a median contamination rate of 5.3% of all cultured corneas

(Fig. 4). The contamination data before 1995 could not be verified on original documents. From 2000 to 2006, the contamination rate was slightly above 5% (5–8.4%); this increased to 12.5% in 2007 and further to 19.4% in 2008 and 17.4% in 2009. Since then, a decrease to 10.3% has been observed.

Discussion

The analysis of more than 10 000 corneas from the HEB-DB provides valuable information on a wide range of aspects (Table 1). To the best of our knowledge, this report describes the largest number of procured corneas from a single eye bank collected over the course of 30 years. However, so far, the database does not hold information on the clinical outcome of performed keratoplasties.

The age distribution of donors was comparable to published results from other eye banks (Patel et al. 2005) with a median donor age of 62 years. As expected, the eligibility of donor corneas for transplantation was strongly dependent on their ECD at the time of explantation (Table 2) and was associated with donor age. Several clinical and experimental studies have shown that the average ECD reduces annually between 0.3% and 0.6%, with a concomitant increase in polymegathism and pleomorphism because of age-related changes in the cornea (Blatt et al. 1979; Carlson et al. 1988; Bourne et al. 1997; Rao et al. 2000; Hashemian et al. 2006; Yunliang et al. 2007; Laule et al. 1978; Culbertson et al. 1982; Yee et al. 1985; Mattern et al. 1995; Probst et al. 1997; Gavrillov et al. 2010). A higher proportion of postcataract-surgery eyes with inherent lower cell count because of subclinical surgical damage of the endothelium (Probst et al. 1997) might add to the lower ECD in mature donors. Our statistical analysis also concurs with these age-related studies (Fig. 2); ECD decreased with increasing donor age by 84.2 endothelial cells/mm² per decade, assuming a linear correlation, which represents an annual decrease of 0.3%. This reduction in ECD results in a reduced number of corneas from elder donors being transplanted (Table 3). However, even so, many corneas from donors older than

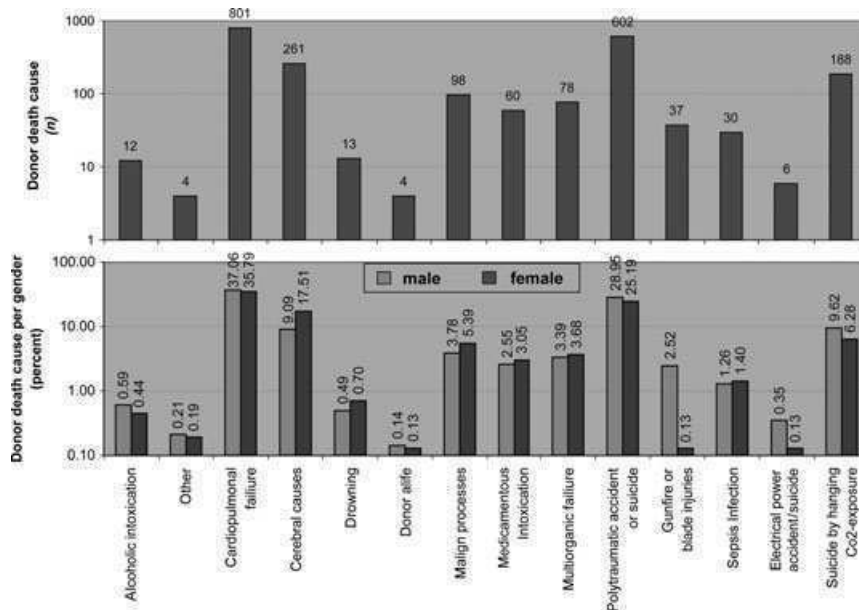


Fig. 3. Defined causes of donor death (number of corneas) and gender-dependent distribution of causes of death (per cent).

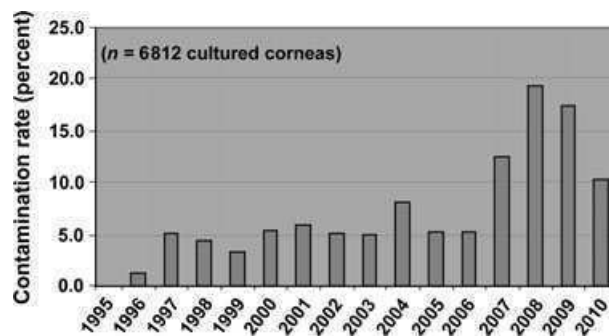


Fig. 4. Yearly corneal culture medium contamination rates (per cent).

80 years (31.2%) were of a quality sufficient for transplantation. Whereas Patel et al. (2005) reported that 80% of donor corneas from the oldest age group were of sufficient standard to be transplanted, several other eye banks reported rates of corneal utilization at advanced donor age that were similar to our results [23% (Moyes et al. 1995), 45% (Armitage & Easty 1997), 53% (Gain et al. 2002) for donors aged 70, 75 and over 80 years, respectively]. Those who do not meet the donation criteria based on ocular (corneal scar, herpetic eye disease, low ECD) or medical contraindications [haematologic malignancy, unclear dementia, serological HIV-, Hepatitis B- and C positivity, serological indications for treponema infection, signs for sexual promiscuity;

all according to the actual medical guidelines and the German tissue regulation (Gewebeverordnung)] are generally excluded prior to the procurement of their tissue. However, as we face a persistent shortage of donor corneas, we, as did Gain et al. (Gain et al. 2002), recommend including the oldest age group for cornea donation.

An interesting observation is the apparent negative association of the DEI on the endothelial cell count. The correlation is however weak (Pearson's correlation = -0.077). As shown, we could demonstrate that older donors tend to have lower endothelial cell counts (Fig. 2; Pearson's correlation -0.341 ; $p < 0.001$) – now, the DEI also correlates (positively) with donor age (Pearson's correlation = 0.143 ; $p < 0.001$). We there-

fore conclude that decreasing cell counts found at increasing DEIs might exclusively depend on the parallel donor age increase.

The preponderance of male donors at the HEB (64.8% of all donors) corresponds to the results published by other eye banks (Patel et al. 2005). Statistically, men die earlier than women [peak of male deaths is between 70 and 79 years compared with female deaths between 80 and 89 years (Statistisches Bundesamt 2010; Oktober 25)]. This is attributed to higher male mortalities from traumata and cardiovascular diseases. The comparable number of male and female donors who died as a result of trauma or cardiovascular failure observable in our data (Fig. 3) has to be interpreted as a selection bias for young cornea donors. Further comprehensive analyses will uncloze, whether and how death causes (and other biological donor properties) have an impact on important cornea quality parameters as endothelial cell count, endothelial loss during culture and others.

In 1985, with the change in standard HEB policy from hypothermic to organ culture storage, the storage duration increased from a maximum of 7–10 days to 23 days (Fig. 1B). Increased storage duration allowed improved microbiological and serological screening for tissue-compatibility matching and subsequent allocation. The storage methods used by different eye banks around the world vary significantly (Bourne 1983; Tullo & Dyer 1995; Chu 2000; Ehlers 2002). Hypothermic storage decreases costs and requires less complex technical equipment. It has also been suggested that short-term storage has positive effects on corneal swelling and endothelial viability (Szaflik et al. 2000). However, several studies have clearly shown that ECD and morphology are well maintained even up to 35 days of storage in organ culture (Doughman 1980; Lindstrom et al. 1992; Probst et al. 1997) and that, postoperatively, survival and corneal thickness were similar compared with short-term storage (Ehlers 2002). However, we found an average rate of endothelial cell loss per week of cultivation of 5.7% (Fig. 1C). An extrapolation to the average cultivation time (23 days) reveals that, on average, 17.5% endothelial cells will be lost during this period.

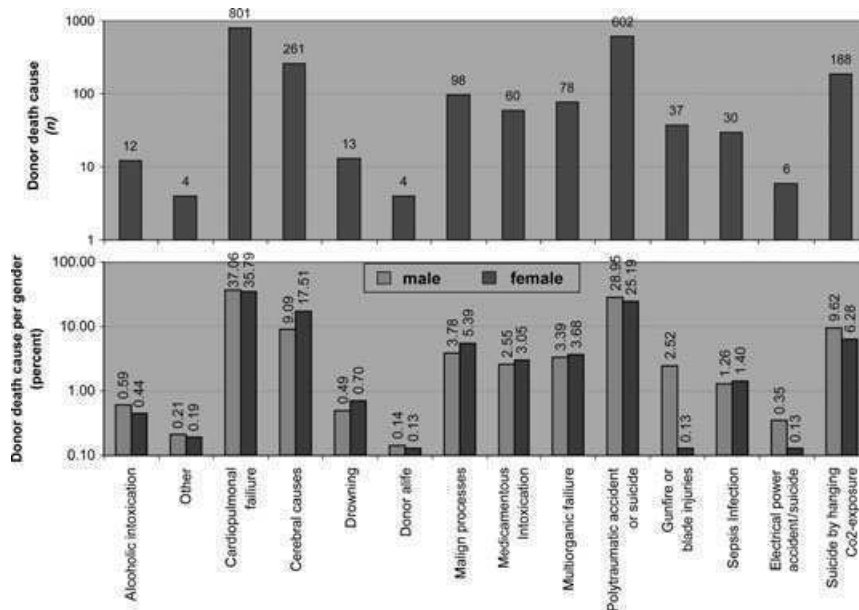


Fig. 3. Defined causes of donor death (number of corneas) and gender-dependent distribution of causes of death (per cent).

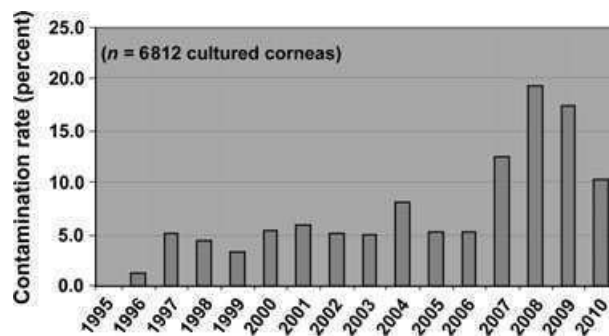


Fig. 4. Yearly corneal culture medium contamination rates (per cent).

80 years (31.2%) were of a quality sufficient for transplantation. Whereas Patel et al. (2005) reported that 80% of donor corneas from the oldest age group were of sufficient standard to be transplanted, several other eye banks reported rates of corneal utilization at advanced donor age that were similar to our results [23% (Moyes et al. 1995), 45% (Armitage & Easty 1997), 53% (Gain et al. 2002) for donors aged 70, 75 and over 80 years, respectively]. Those who do not meet the donation criteria based on ocular (corneal scar, herpetic eye disease, low ECD) or medical contraindications [haematologic malignancy, unclear dementia, serological HIV-, Hepatitis B- and C positivity, serological indications for treponema infection, signs for sexual promiscuity;

all according to the actual medical guidelines and the German tissue regulation (Gewebeverordnung)] are generally excluded prior to the procurement of their tissue. However, as we face a persistent shortage of donor corneas, we, as did Gain et al. (Gain et al. 2002), recommend including the oldest age group for cornea donation.

An interesting observation is the apparent negative association of the DEI on the endothelial cell count. The correlation is however weak (Pearson's correlation = -0.077). As shown, we could demonstrate that older donors tend to have lower endothelial cell counts (Fig. 2; Pearson's correlation -0.341 ; $p < 0.001$) – now, the DEI also correlates (positively) with donor age (Pearson's correlation = 0.143 ; $p < 0.001$). We there-

fore conclude that decreasing cell counts found at increasing DEIs might exclusively depend on the parallel donor age increase.

The preponderance of male donors at the HEB (64.8% of all donors) corresponds to the results published by other eye banks (Patel et al. 2005). Statistically, men die earlier than women [peak of male deaths is between 70 and 79 years compared with female deaths between 80 and 89 years (Statistisches Bundesamt 2010; Oktober 25)]. This is attributed to higher male mortalities from traumata and cardiovascular diseases. The comparable number of male and female donors who died as a result of trauma or cardiovascular failure observable in our data (Fig. 3) has to be interpreted as a selection bias for young cornea donors. Further comprehensive analyses will uncloze, whether and how death causes (and other biological donor properties) have an impact on important cornea quality parameters as endothelial cell count, endothelial loss during culture and others.

In 1985, with the change in standard HEB policy from hypothermic to organ culture storage, the storage duration increased from a maximum of 7–10 days to 23 days (Fig. 1B). Increased storage duration allowed improved microbiological and serological screening for tissue-compatibility matching and subsequent allocation. The storage methods used by different eye banks around the world vary significantly (Bourne 1983; Tullo & Dyer 1995; Chu 2000; Ehlers 2002). Hypothermic storage decreases costs and requires less complex technical equipment. It has also been suggested that short-term storage has positive effects on corneal swelling and endothelial viability (Szaflik et al. 2000). However, several studies have clearly shown that ECD and morphology are well maintained even up to 35 days of storage in organ culture (Doughman 1980; Lindstrom et al. 1992; Probst et al. 1997) and that, postoperatively, survival and corneal thickness were similar compared with short-term storage (Ehlers 2002). However, we found an average rate of endothelial cell loss per week of cultivation of 5.7% (Fig. 1C). An extrapolation to the average cultivation time (23 days) reveals that, on average, 17.5% endothelial cells will be lost during this period.

Postoperative infectious keratitis and endophthalmitis are rare, but potentially sight-threatening complications of corneal transplantation. Therefore, donor screening, microbiological screening and decontamination of donor tissue are eye bank priorities. During the period reported here, a median of 5.3% of all donor corneas were discarded because of contamination. Values from other eye banks vary widely from 4 to 37% for hypothermic storage (Pardos & Gallagher 1982; Kloess et al. 1993; Reed et al. 1994; Gomes et al. 1995) and 0.6% to 16% for organ culture storage (Erb- ezci et al. 1995; Hagenah et al. 1995; Builles et al. 2006; Fontana et al. 2007; Hermel et al. 2010). The contamination rate in our study increased significantly between 2006 and 2007 and reaching 19.4% in 2008 and 17.4% in 2009. Thereafter, contamination rates decreased rapidly to the current rate of 10.3%. The increase, since 2007, could be caused by an alteration of the cornea procurement procedure: excision of the corneoscleral button rather than enucleation was introduced in 2007 but only became the standard procedure for corneal tissue procurement at the HEB in 2008. *In situ* corneoscleral disc explantation is potentially more prone to contamination, which is reflected in the peak contamination events in the year that our eye bank began to switch to this new technique. However, optimized decontamination and handling techniques, as well as specific training of the eye bank staff performing all retrievals, resulted in a rapid decrease in contamination frequencies of donor corneas.

The average corneal utilization rate identified in this study (43.5%) is somewhat below those published by other eye banks. Williams et al. (Williams et al. 1990) reported that 55% of the 1580 corneas collected in the Lions Eye Bank of Australia were transplanted; noteworthy in this study is that only cornea with an ECD of <1500 cells/mm² were discarded. Patel et al. (2005) reported a utilization rate of 79.1% in the New Zealand National Eye Bank Study for 1991–2003. Our utilization ratios display a generally upwards trend over the years, peaking in 1989 (68%) and 2007 (75%) (Fig. 1A). Although there were decreasing num-

bers of cultured corneas and increasing utilization ratios (Fig. 1A) between 1988 and 2007, the absolute number of transplanted corneas, endothelial integrity and endothelial cell loss per week of cultivation was relatively stable (Fig. 1A–C). This indicates that the reduced cornea transplantation ratio may be the consequence of the contemporaneous legal situation, the structural circumstances of donor recruiting or transplantation activity rather than a result of problems in cornea cultivation routine. The most likely reason for the increasing utilization rate since 2003 is the thorough pre-screening of potential donors (for age and medical contraindications) before procurement of tissue. In 2004, a European Directive on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissue and cells entered into force (Directive 2004/23/EC). This guideline was complemented by two additional directives in 2006 (2006/17/EC and 2006/86/EC) focusing on the management of donation, procurement and testing of human tissues and cells, as well as the traceability, notification of serious adverse events, coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. These requirements were established in our laboratory mainly before 2004 (at the very latest by 2006/2007). This is mirrored by the decrease in cultured corneas and the increased culturing times since 2004/2005. Owing to the restrictions required to implement these directives, we changed the eye bank's policy and no longer applied a donor age restriction, as donor age was not restricted by the directives. In spite of the change in the policy regarding the donor age, this directive led to a decrease in the number of donor corneas as well as in the number of transplanted corneas. Because the latter decrease was less pronounced, an increase in the share of transplanted corneas was observed. The strong decrease in the share of transplanted corneas in 2007 can be explained by the shift in explantation technique (corneoscleral disc versus whole globe), which was initially associated with a higher contamination rate. Nevertheless, the

numbers for 2009 show that the introduction of this new technique did not affect the number of donor corneas or the number of transplanted corneas.

The HEB-DB provides comprehensive information on many aspects of eye banking for more than 10 000 corneas. Over the 30-year period analyzed, various trends and changes were identified in relation to donor demographics, procurement, tissue processing and storage, biological contamination and utilization of donor corneas. Future studies adding clinical outcome of transplanted corneas will help to further improve the safety, efficiency and prognosis of cornea procurement, culturing and subsequent transplantation.

Acknowledgements

We thank Sibylle Altenähr for her excellent technical assistance. The results of this study were presented at the 60th conference of the Vereinigung Norddeutscher Augenärzte (Association of Northern German Ophthalmologists), Neubrandenburg, Germany 25 June 2011. No funding or other financial support was received.

References

- Armitage WJ & Easty DL (1997): Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**: 16–24.
- Blatt HL, Rao GN & Aquavella JV (1979): Endothelial cell density in relation to morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**: 856–859.
- Bohnke M (1991a): Corneal preservation in organ-culture. *Curr Opin Ophthalmol* **2**: 432–442.
- Bohnke M (1991b): Donor tissue for keratoplasty. Report of experiences by the Hamburg cornea bank. *Klin Monbl Augenheilkd* **198**: 562–571.
- Bourne WM (1983): Morphologic and functional evaluation of the endothelium of transplanted human corneas. *Trans Am Ophthalmol Soc* **81**: 403–450.
- Bourne WM, Nelson LR & Hodge DO (1997): Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**: 779–782.
- Builles N, Perraud M, Reverdy ME, Burillon C, Crova P, Brun F, Chapuis F & Damour O (2006): Reducing contamination when removing and storing corneas: a multidisciplinary, transversal, and environmental approach. *Cornea* **25**: 185–192.

- Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW & Brubaker RF (1988): Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res* **47**: 27–41.
- Culbertson WW, Abbott RL & Forster RK (1982): Endothelial cell loss in penetrating keratoplasty. *Ophthalmol* **89**: 600–604.
- Chu W (2000): The past twenty-five years in eye banking. *Cornea* **19**: 754–765.
- Doughman DJ (1980): Prolonged donor cornea preservation in organ culture: long-term clinical evaluation. *Trans Am Ophthalmol Soc* **78**: 567–628.
- Ehlers N (2002): Corneal banking and grafting: the background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. *Acta Ophthalmol Scand* **80**: 572–578.
- Erbezi M, Monnot PH, Michel-Briand Y, Masse M & Delbosc B (1995): Organ culture preservation of the human cornea at +31 degrees C and risk of infection. *J Fr Ophthalmol* **18**: 106–113.
- Filatov VP (1935): Transplantation of the cornea. *Arch Ophthalmol* **13**: 321–347.
- Fontana L, Errani PG, Zerbini A, Musacchi Y, Di Pede B & Tassinari G (2007): Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea* **26**: 552–556.
- Gain P, Thuret G, Chiquet C et al. (2002): Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol* **86**: 404–411.
- Gavrilov JC, Borderie VM, Laroche L & Delbosc B (2010): Influencing factors on the suitability of organ-cultured corneas. *Eye (Lond)* **24**: 1227–1233.
- Gomes JA, Dana MR, Dua HS, Goren MB, Laibson PR & Cohen EJ (1995): Positive donor rim culture in penetrating keratoplasty. *Cornea* **14**: 457–462.
- Hagenah M, Bohnke M, Engelmann K & Winter R (1995): Incidence of bacterial and fungal contamination of donor corneas preserved by organ culture. *Cornea* **14**: 423–426.
- Hashemian MN, Moghimi S, Fard MA, Fallah MR & Mansouri MR (2006): Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmol* **6**: 9.
- Hermel M, Salla S, Hamsley N, Steinfeld A & Walter P (2010): Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **248**: 117–126.
- Kloess PM, Stulting RD, Waring GO III & Wilson LA (1993): Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* **115**: 309–316.
- Laule A, Cable MK, Hoffman CE & Hanna C (1978): Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* **96**: 2031–2035.
- Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL et al. (1992): Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* **114**: 345–356.
- Mattern RM, Heck EL & Cavanagh HD (1995): The impact on tissue utilization of screening donor corneas by specular microscopy at the University of Texas Southwestern Medical Center. *Cornea* **14**: 562–567.
- Moyes AL, Holland EJ, Palmon FE, Dvorak JA & Doughman DJ (1995): Tissue utilization at the Minnesota Lions' Eye Bank. *Cornea* **14**: 571–577.
- Naydis I, Klemm M, Hassenstein A, Richard G, Katz T & Linke SJ (2011): Postkeratoplasty astigmatism: comparison of three suturing techniques. *Ophthalmologie* **108**: 252–259.
- Pardos GJ & Gallagher MA (1982): Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. *Arch Ophthalmol* **100**: 1611–1613.
- Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, Sherwin T, Ormonde S, Clover GM & McGhee CN (2005): The New Zealand National Eye Bank study 1991–2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea* **24**: 576–582.
- Probst LE, Halfaker BA & Holland EJ (1997): Quality of corneal donor tissue in the greater-than-75-year age group. *Cornea* **16**: 507–511.
- Rao SK, Ranjan Sen P, Fogla R, Gangadharan S, Padmanabhan P & Badrinath SS (2000): Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea* **19**: 820–823.
- Reed JW, Bealer LA, Sloop CM & Davis RM (1994): Questionable benefit of cultures at the time of penetrating keratoplasty. *Cornea* **13**: 101.
- Schroeter J, Maier P, Bednarz J, Bluthner K, Quenzel M, Pruss A & Reinhard T (2009): Procedural guidelines. Good tissue practice for cornea banks. *Ophthalmologie* **106**: 265–274, 276.
- Seitz B, Langenbucher A & Naumann GO (2005): The penetrating keratoplasty. A 100-year success story. *Ophthalmologie* **102**: 1128–1136.
- Statistisches Bundesamt (2010): Todesursachenstatistik. Bonn, Stand 30.06.2011.
- Szaflik J, Liberek I & Brix M (2000): Corneal storage methods. *Transplant Proc* **32**: 1424–1425.
- Tullo AB & Dyer PA (1995): Corneal transplantation in Britain. *BMJ* **310**: 1347–1348.
- Williams KA, White MA, Badenoch PR et al. (1990): Donor cornea procurement: six-year review of the role of the eye bank in South Australia. *Aust N Z J Ophthalmol* **18**: 77–89.
- Yee RW, Matsuda M, Schultz RO & Edelhauser HF (1985): Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* **4**: 671–678.
- Yunliang S, Yuqiang H, Ying-Peng L, Ming-Zhi Z, Lam DS & Rao SK (2007): Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Chinese eyes. *Cornea* **26**: 130–132.

Received on July 20th, 2011.
Accepted on April 16th, 2012.

Correspondence:
Dr Stephan J. Linke
Department of Ophthalmology
University Medical Center
Hamburg-Eppendorf (UKE)
Martinistr 52, 20246 Hamburg
Germany
Tel: + 49 40 7410 53331
Fax: + 49 40 7410 58664
Email: slinke@uke.uni-hamburg.de

10. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

In dieser Publikationspromotion habe ich mit Hilfe von Dr. Olaf Hellwinkel, dem Leiter der Hamburger Hornhautbank, alle verwendeten Datensätze von über 10 000 Spenderaugen, die in der Hornhautbank von 1981 bis 2010 kultiviert wurden, kontrolliert, abgeglichen und bearbeitet. Der größte Teil war zwar bereits elektronisch erfasst, musste jedoch neu kategorisiert werden. Zum Beispiel waren die Angaben von Todesursachen und Grunderkrankungen der ca. 5500 Spender nicht in einheitlicher Weise dokumentiert und erforderten somit eine erneute Begutachtung und Kategorisierung. Die verschiedenen diversen Analysen wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Hellwinkel erstellt.

Die schriftliche Verfassung der Publikation erfolgte in wechselseitiger Bearbeitung mit Dr. Stephan Linke, wobei Dr. Hellwinkel und Dr. Fricke Korrektur lasen. Bei der Literaturrecherche wurde ich von Otto Fricke unterstützt.

Danksagung und Widmung

Ich widme diese Publikation meiner geliebten Mutter Moun-Ja Lee Eddy, die vor 3 Jahren unerwartet verstarb, und auf deren Wunsch ich Mediziner wurde. Leider konnte ich aufgrund des großen persönlichen Verlustes und der familiären Veränderungen meine im Studium begonnene molekularbiologische Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover und Harvard Medical School/ Childrens Hospital Boston nicht beenden.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Gisbert Richard bedanken, der es mir ermöglichte diese Dissertation in der Klinik für Augenheilkunde anzufertigen. Besonders danke ich auch Dr. Stephan Linke und Dr. Olaf Hellwinke für die wundervolle und lehrreiche Betreuung. Beide gaben mir zahlreiche Anregungen und Vorschläge zu dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Otto Fricke und Sybille Altenair für Ihre Unterstützung in der Hornhautbank.

Auch möchte ich mich bei meinen Schwestern Mee-Ling Eddy und Dr. Thek-Ling Eddy, sowie meinem Vater Dr. Hartono Eddy, meinem gutem Freund Dr. Johannes

Steinberg und meiner Patententante Zom-Num Bae für hilfreiche Ratschläge, Motivation und persönliche Unterstützung bedanken

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....

CURRICULUM VITAE

Mau-Thek Eddy

Tarpenbekstr.78 :20251 Hamburg

M.Eddy80@gmail.com

Geburtsdatum: 23.02.1980
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Eltern: Vater: Dr.med. Hartono Eddy (Überseeschinese aus Indonesien)
Mutter: Moun-Ja Lee-Eddy (Südkoreanerin) †

Schulbildung:

1986 - 1990 Katholische Grundschule Marienschule in Georgsmarienhütte
1990 - 1992 Katholische Orientierungsstufe Dom-Schule in Osnabrück
1992 - 1995 Christlich-humanistisches Gymnasium Carolinum in Osnabrück
1995 - 1999 Staatl. anerkanntes freies Gymnasium in katholischer Trägerschaft
Cäcilien-schule in Wilhelmshaven

Zivildienst

07.1999- 09.1999 Labor-Assistent im Zentrallabor des Reinhardt-Nieter-Krankenhaus
Wilhelmshaven

Hochschulbildung:

10.2000 Beginn des Medizin-Studiums an der Medizinischen Hochschule Hannover
09.2002 Ärztliche Vorprüfung
08.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.2005- 01.2006 Teilnahme am „BioMedical Science Exchange Program“ mit der „Harvard-
Medical- School/Children´s Hospital Boston“
08.2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10.2006-02.2007 Medizinisches Klinik I der Henriettenstiftung Hannover
02.2007-04.2007 Hand-,Plastische- und Wiederherstellungschirurgie der MHH
04.2007-05.2007 Department of Prediatric Cardiac Surgery des Childrens Hospital Boston/
Harvard Medical School
05.2007-07.2007 Department of Anesthesiology des Childrens Hospital Boston/ Harvard
Medical School
07.2007-09.2007 Klinkum der Anästhesie der MHH

Berufliche Laufbahn

02.2008 bis 09.2009 Augenklinik der Universitätsklinik Düsseldorf
07.2008 Hospitation in der Elektrophysiologie der Charité
11.2009 bis heute Augenklinik der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

Stipendia und Preise:

07.1999 Auszeichnung von der Gesellschaft der Deutschen Chemie-Industrie

2004/5: Teilnahme an dem BMEP Programm mit der Harvard Medical
School, unterstützt durch die DAAD

02.2005-12.2005 Stipendium vom NIH (Nationaler Institute of Health) in den USA

Publikationen

2006: *American Journal of Pathology* "Cardiac Conduction through Engineered Tissue." Choi YH, Stamm C, Hammer PE, Kwaku KF, Illigens BMW, Friehs I, Roy N, Eddy MT, Tridman J, McGowan FX, del Nido PJ, Cowan DBC ;Vol. 169, No. 1, July 2006

2006: *International journal of molecular medicine* "Sequence analysis shows that Lifeguard belongs to a new evolutionarily conserved cytoprotective family" Reimers K, Choi CY, Mau-Thek E, Vogt PM; 18(4):729-34; October 2006

2010 Apoptosis. 2010 „Transactivation of lifeguard (LFG) by Akt-/LEF-1 pathway in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells." Bucan V, Adili MY, Choi CY, Eddy MT, Vogt PM, Reimers K. Jul;15(7):814-21

2010 Cell Mol Biol Lett. Epub 2010 Mar 19. "The anti-apoptotic protein lifeguard is expressed in breast cancer cells and tissues." Bucan V, Reimers K, Choi CY, Eddy MT, Vogt PM. 2010 Jun;15(2):296-310

2010 Augenspiegel "Posteriore Glaskörperabhebung nach LASIK?" M-T Eddy, D Pantazis, J Steinberg, G Richard, T Katz, SJ. Linke. 12/2010

2011 Case Report Ophthalmol. "Bilateral crystalline corneal deposits as first clinical manifestation of monoclonal gammopathy: a case report." Steinberg J, Eddy MT, Katz T, Matthiessen E, Fricke OH, Richard G, Linke SJ. 2011 May;2(2):222-7

2011 Cataract Refract Surg. "Relationship between minimum corneal thickness and refractive state, keratometry, age, sex, and left or right eye in refractive surgery candidates. " Linke SJ, Steinberg J, Eddy MT, Richard G, Katz T. J 2011 Dec;37(12):2175-80.

2012 Eur J Ophthalmol. "Traumatic wound dehiscence after penetrating keratoplasty: case series and literature review." Steinberg J, Eddy MT, Katz T, Fricke OH, Richard G, Linke SJ. 2012 May-Jun;22(3):335-41

In Print

-*Der Ophthalmologe* "Severe contact lens-associated fungal keratitis"

-*Cornea* "Risk Factors for Donor Cornea Contamination: A Retrospective Analysis of 4546 Procured Corneas in a Single Eye Bank "