

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szemészeti Klinikájának
(igazgató: Berta András egyetemi tanár) közleménye

Corneakonzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálata

MÓDIS LÁSZLÓ, NÉMETH GÁBOR, TAKÁCS LILI, CSUTAK ADRIENN, KETTESY BEÁTA,
BERTA ANDRÁS

Célkitűzés: Négy különböző corneakonzerváló folyadék (két középtávú [Likorol és Optisol] és két középhosszú távú [IMDM és Inosol]) összehasonlítása műtéti felhasználás előtt.

Módszerek: Corneakonzerváló szerenként 8–8, összesen 32 corneát vizsgáltunk. Meghatároztuk a centrális átlagos endothelsejtszámot és morfológiát tripánkék-festés után fáziskontraszt inverz mikroszkóppal, a konzerváló folyadékok átlagos glükóz- és laktátszintjét enzimatisz módszerrel és az oldatok esetleges kontaminációját Transpocult táptalajra leoltás segítségével. A vizsgálatokat konzerválás előtt és a konzerválás utáni 7., 14., 21. és 28. napon végeztük. A kísérletsorozat végén a corneákat fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá.

Eredmények: Az átlagos endothelsejtszám Optisolnál 4000-ről 1940 sejt/mm²-re, Likorolnál 3880-ról 610/mm²-re, Inosolnál 3060-ról 2200/mm²-re, IMDM-nél 3640-ről 2740/mm²-re csökkent a 28 nap alatt. A biokémiai vizsgálatok eredményei szerint a glükózsintek lassú csökkenése volt megfigyelhető mind a négy konzerváló oldatnál, míg a laktátszintek emelkedése a középhosszú távú módszerek esetében jelentősebb volt, mint a középtávúaknál. Hisztológiai vizsgálatok során az endothelsejtek degenerációját észleltük. Fertőzés nem fordult elő.

Összefoglalás: Mind a négyféle konzerváló folyadék alkalmasnak bizonyult corneák tartósítására szaruhártya-átültetésekhez. Az endothelsejtszám önmagában nem, csak morfológiai sajátosságaival együtt jellemzi a cornea funkcionális állapotát. Hosszabb távra (3 hét) tervezett műtéteknél középhosszú távú sejtenyészítő oldatokban való szaruhártya-konzerválást ajánlunk.

Kulcsszavak: corneakonzerválás, konzerváló folyadékok, endothelsejtszám, endothelium morfológia, tripánkék- és alizarinvörös-festés

A COMPARATIVE STUDY OF CORNEAL PRESERVATION MEDIA

Purpose: The aim of the study was to compare four different corneal preservation media (two intermediate term [Likorol and Optisol] and two intermediate-long term [IMDM and Inosol]) before surgical use.

Methods: Eight corneas were studied in each medium, altogether 32 corneas were examined. After trypanblue staining the central mean endothelial cell count and morphology were defined with inverse phase contrast microscope. The average glucose and lactate levels of the solutions were measured by enzymatic methods and Transpocult culture medium was used to indicate the possible contamination of the preservation liquids. The investigations were performed before preservation and on the 7th, 14th, 21th, and 28th, days after preservation. Finally, the corneas were studied by light and electron microscopy.

Results: The mean endothelial cell count decreased from 4000 to 1940 cell/mm² in Optisol, from 3880 to 610/mm² in Likorol, from 3060 to 2200/mm² in Inosol, and from 3640 to 2740/mm² in IMDM by the 28th day. According to biochemical studies in all four preservation media glucose levels gradually decreased, whereas in cases of intermediate-long term storage the increase of lactate levels was more significant than in intermediate ones. Histological observations disclosed degeneration of endothelial cells. No contamination occurred during the observation period.

Conclusions: All the four preservation media were proved to be suitable for cornea supply for keratoplasty. The functional state of the cornea cannot be determined by cell count itself but only together with its morphological characteristics. For pre-planned (3 weeks) surgery corneal preservation in intermediate-long term organ culture is recommended.

Keywords: corneal preservation, preservation media, endothelial cell count, endothelial morphology, trypanblue and alizarinred staining.

A szemészetben a ma már rutinműtétnek számító szaruhártya-átültetésekhez a hatvanas évektől kezdve az USA-ban,^{1,3} a hetvenes évektől pedig Európában²⁵ is egyre nagyobb számban használnak konzervált corneákat, a donor-szűrés, a minőségellenőrzés ("quality control") és a műtét

tek tervezhetősége miatt. Magyarországon ez a változás a 90-es évek közepére tehető, amikor megalakult a Budapesti és Debreceni Szembank.^{16,17,18} A friss, nedves kamrában tárolt corneákról a konzervált szaruhártyákra való áttérés azonban esetleges buktatókat is magában rejtő, hosszú fo-

lyamat. A tartósított corneák felhasználása egészen más laboratóriumi háttérrel, előkészületeket és természetesen más műtéti technikákat igényel.

A kísérletsorozat célja az volt, hogy klinikai felhasználás előtt a Magyarországon jelenleg beszerezhető corneakonzerváló folyadékokat összehasonlítsuk. Két középtávú konzerváló folyadékot (Likorol [Chauvin-Opsia, Franciaország] és Optisol [Chiron Ophthalmics, USA]), valamint két középhosszú távú médiumot (Inosol [Chauvin-Opsia] és Iscove's Modified Dulbecco Medium [IMDM, Sigma, USA]) vizsgáltunk. A négyhetes vizsgálat során meg kívántuk határozni a centrális cornealis endothelium sejtszámának és morfológiájának változását. Szintén nyomon akartuk követni a szaruhártyák anyagcsere-változását és az oldatok esetleges kontaminációját. A vizsgálati idő végén pedig a különböző módon tartósított corneákat szövettani vizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálat végső célja az volt, hogy ezen adatok alapján megpróbáljuk a szaruhártya-átültetésekhez legjobban megfelelő konzerváló oldatot kiválasztani.

Módszerek

A két középtávú (Optisol és Likorol) és a két középhosszú távú (Inosol és IMDM) corneatároló folyadékban 8–8, összességében 32 normális humán szaruhártyát konzerváltunk négy héten (28 nap) keresztül. A kísérletsorozatban használt corneák átlagéletkora 56 év volt (a legidősebb donor 76 éves, a legfiatalabb 28 éves volt). A halál és az enucleatio közt eltelt idő átlagosan 7 óra (legkevesebb 0,5 óra, legtöbb 10 óra) volt. A fél órával a halál után eltávolított donorszövet multiorganikus vesedonorból származott. A halál és a corneoscleralis excisio között átlagosan 8,7 óra (legkevesebb 0,5 óra, legtöbb 14 óra) telt el. A kísérletsorozat minden lépését a sterilitás szabályait követve, lamináris boksban végeztük, illetve készítettük elő. A középtávú médiumokat +4 °C-on hűtőszekrényben, a középhosszú távú oldatokat pedig +37 °C-on 5%-os telítettségű CO₂-termosztátban tároltuk.

Endothelsejt-morfológia és endothelsejtszám: A centrális cornealis endotheliumot a konzerválás előtt, valamint a 7., a 14., a 21. és a 28. napon fáziskontraszt inverz mikroszkópiával vizsgáltuk. Ehhez a vizsgálatához a corneákat endothelialis oldallal felfelé steril Petri-csészében helyeztük el, és 1 percig 0,4%-os vitális tripánkéék festékkel festettük. A 28. nap után az endothelium pontosabb vizsgálatához egyperces alizarinvörös-festést is alkalmaztunk, amely nemcsak a sejtközi állományt, hanem az elhalt sejteket és sejtmagokat is megfesti. (Utóbbi módszert azért csak a 28. nap után alkalmaztuk, mert az alizarinvörös toxikus hatású.) A festés után előkészített corneákat a Petri-

csészében helyeztük a mikroszkóp alá. A mikroszkóphoz csatolt videokamera a látott képet monitoron is megjelenítette. Ezzel egy időben a képernyőre vetítettük azt az előzetesen Bürker-kamra segítségével kalibrált négyzethálót is, amelynek felhasználásával a sejtszámolást végeztük. A sejtszámlálást és az endothelmorfológia megítélését a kísérletsorozat időtartama alatt egy ugyanazon vizsgáló végezte, a cornea centrális részén legalább három különböző látómező sejtszámátlagát véve figyelembe.

Biokémiai vizsgálatok: Ugyancsak a fent említett 7 napos periódusban a cornea anyagcseréjének indirekt nyomon követéséhez meghatároztuk a konzerváló médiumok átlagos glükóz- és laktátszintjét enzimatiszus módszer segítségével.

Mikrobiológiai vizsgálatok: a 0., 7., 14., 21. és a 28. napon mintát vettünk a tápfolyadékokból Transpocult táptalajra (Espoo, Finnország) leoltva, az esetleges aerob, anaerob és gombás fertőzés kimutatására.

Hisztológiai vizsgálatok: A 4 hetes periódus végén a corneákat középen kettévágtuk, felét fény-, felét elektronmikroszkópos feldolgozásnak vetettük alá. Mindkét esetben konvencionális hisztológiai módszereket követtünk: fénymikroszkópos vizsgálat során formalinfixálás és paraffinbeágyazás, majd hematoxin-eozin és PAS-festés történt. Az elektronmikroszkópos mintákat 2,5%-os glutáraldehidben fixáltuk, majd 1%-os ozmium-tetroxidos utórögzítést követően Durcupan gyantába ágyaztuk.

Statisztika: A leíró statisztikai adatokat az átlag és a szórási numerikus és grafikus megjelenítésével jellemeztük. Az egyes oldatok időbeni változó értékeit (sejtszám, glükóz- és laktátszint) Wilcoxon-teszt segítségével vetettük össze. Korrelációs analízishez meghatároztuk a korrelációs koefficiens (r) Spearman szerint. A $p \leq 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

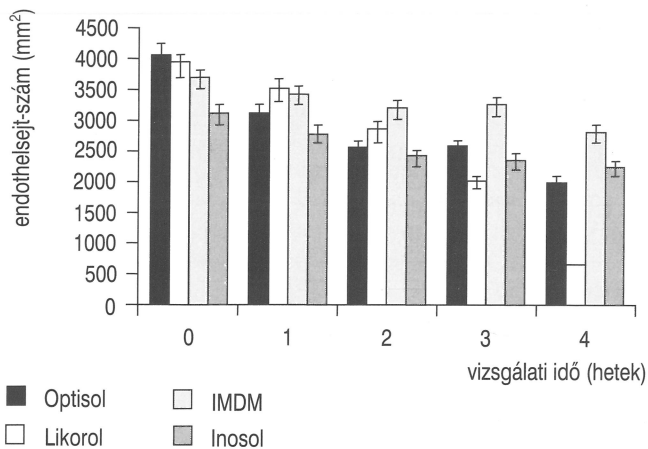
Endothelsejt-morfológia és endothelsejtszám (1. ábra és 1. táblázat)

Optisolban konzervált corneák esetében az átlagos centrális endothelium sejtszám hét nap eltelte után 4000/mm²-ről 3060/mm²-re ($p=0,01$), a 14. napra 2500/mm²-re csökkent ($p=0,01$). A harmadik héten a sejtszám nem mutatott további csökkenést (2520/mm², $p=0,22$), a 28. napon már csak 1940/mm² ($p=0,01$) volt az átlagos sejtsűrűség.

Likorol oldat esetében az első hét végére a kezdeti átlagos 3880/mm² sejtszám 3450/mm²-re csökkent ($p=0,01$), a 14. napon 2800/mm² ($p=0,01$), a 21. napon 1960/mm² ($p=0,01$), a 28. napon 610/mm² ($p=0,01$) volt az endothelsejtsűrűség.

1. táblázat. Az átlagos endothelsejtszám változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban (zárójelben a szóráseértékekkel)

	0. hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
Optisol	4000 (64,6)	3060 (31,8)	2500 (103)	2520 (97,5)	1940 (58)
Likorol	3880 (96,7)	3450 (53,1)	2800 (76,1)	1960 (53,9)	610 (80,2)
IMDM	3640 (129,2)	3360 (101,1)	3140 (135,8)	3180 (85,5)	2740 (80)
Inosol	3060 (106,6)	2750 (90)	2350 (98,1)	2300 (93,3)	2200 (85,2)



1. ábra. Az átlagos endothelsejtszám változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban. Az egyes oszlopokon belül a szórásértékek láthatóak

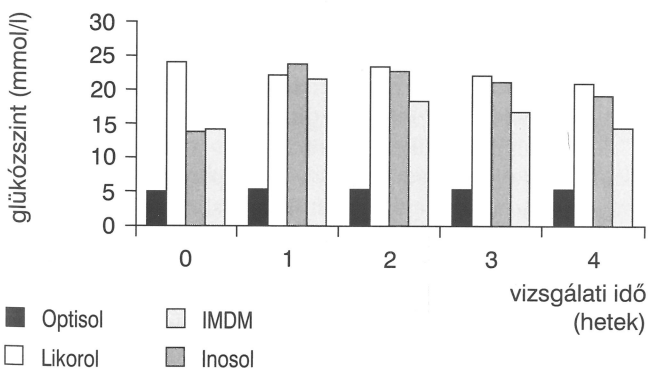
Mindkét középtávú médium esetében a 14. vizsgálati napon a viszonylag magas sejtszám ellenére tripánkék-pozitív elhalt sejtcsoportok jelentek meg (2. ábra). A 28. napra a sejtnekrózis már csaknem az egész endotheliumot jellemezte (3. ábra).

IMDM-nél a kezdeti átlagos sejtszám $3640/\text{mm}^2$, a hetedik napon $3360/\text{mm}^2$ ($p=0,01$), a 14. napon $3140/\text{mm}^2$ ($p=0,01$) volt. A 21. napra további csökkenést nem észleltünk ($3180/\text{mm}^2$, $p=0,11$), a 28. napon pedig $2740/\text{mm}^2$ ($p=0,01$) volt az endothelsejtszám.

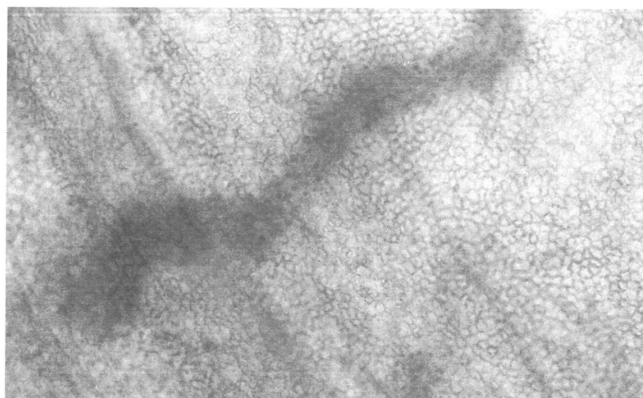
Inosol esetében a kiindulási átlagos sejtszám $3060/\text{mm}^2$ volt. A hetedik napon $2750/\text{mm}^2$ ($p=0,01$), a 14. napon $2350/\text{mm}^2$ ($p=0,01$), a 21. napon $2300/\text{mm}^2$ ($p=0,01$) és a 28. napon $2200/\text{mm}^2$ sejtsűrűséget mértünk ($p=0,01$).

Középhosszú távú médiumokban konzervált corneák esetében csoportos endotheliumsejt-elhalást észleltünk a 28. vizsgálati napon.

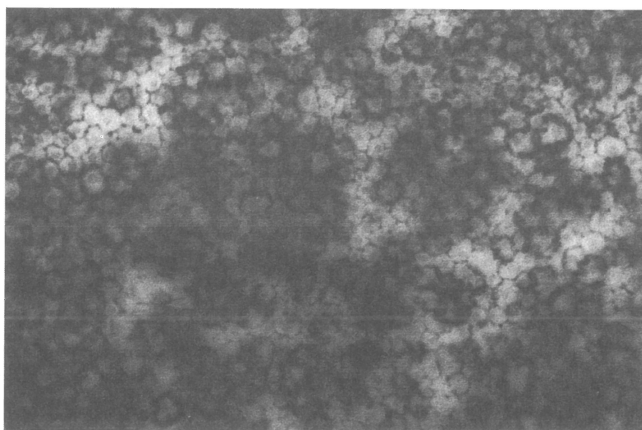
Mind a négy folyadék esetében gyenge és nem szignifikáns korrelációt mutattunk ki a kiindulási sejtszám és az életkor között (Optisol: $r=0,24$, $p=0,56$; Likorol: $r=0,28$, $p=0,3$; IMDM: $r=0,34$, $p=0,44$; Inosol: $r=0,2$, $p=0,6$).



4. ábra. Az átlagos glükózszt szint változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban. (Az alacsony szórásértékeket grafikusán megjeleníteni nem lehetett, lásd 2. táblázat.)



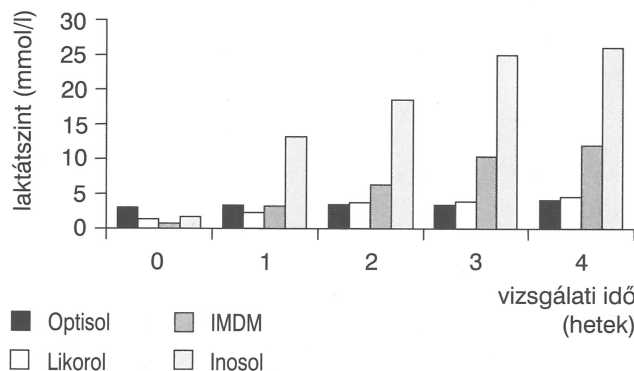
2. ábra. Optisolban konzervált cornea a 14. vizsgálati napon. Jól megfigyelhetők a festődő elhalt endothelsejtcsoportok (fáziskontraszt, tripánkék, eredeti nagyítás 20x)



3. ábra. Likorolban konzervált cornea a 28. nap után. Jól láthatók a pozitívan festődő elhalt endothelsejtek, amelyek csaknem az egész látóteret kitöltik (fáziskontraszt, alizarinvörös, eredeti nagyítás, 20x)

Biokémiai vizsgálatok (4., 5. ábra és 2., 3. táblázat)

A biokémiai paraméterek közül a Likorol és az Optisol átlagos glükózkonzentrációja a 28 napos vizsgálati periód-



5. ábra. Az átlagos laktátszt szint változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban. (Az alacsony szórásértékeket grafikusán megjeleníteni nem lehetett, lásd 3. táblázat.)

2. táblázat. Az átlagos glükózsztint változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban (zárójelben a szórásértékekkel)

	0. hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
Optisol	4,9 (0,05)	5 (0,03)	4,9 (0,07)	4,9 (0,02)	4,9 (0,02)
Likorol	24 (0,11)	22 (0,06)	23 (0,06)	22 (0,02)	20,86 (0,07)
IMDM	13,46 (0,05)	23,55 (0,08)	22,5 (0,1)	20,9 (0,06)	19,2 (0,14)
Inosol	13,9 (0,09)	21,3 (0,1)	17,8 (0,07)	16,7 (0,08)	14,2 (0,03)

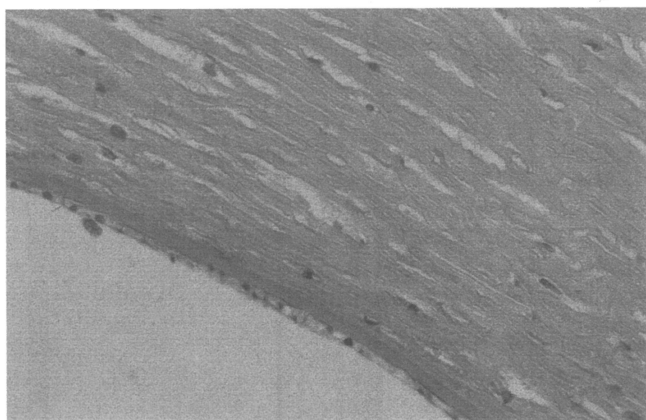
3. táblázat. Az átlagos laktátsztint változása a négy különböző konzerváló folyadékban a kezdeti és a négyhetes vizsgálati periódusban (zárójelben a szórásértékekkel)

	0. hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
Optisol	2,7 (0,02)	2,8 (0,03)	2,82 (0,03)	2,87 (0,03)	3,64 (0,05)
Likorol	0,82 (0,01)	2 (0,06)	3,2 (0,1)	3,4 (0,03)	4,2 (0,1)
IMDM	0,4 (0,05)	2,6 (0,08)	6 (0,07)	9,8 (0,3)	11,57 (0,2)
Inosol	1,3 (0,1)	12,7 (0,04)	18,13 (0,1)	24,33 (0,2)	25,48 (0,2)

dus alatt csaknem változatlan szinten maradt. Előbbinél 24 mmol/l-ről 20,86 mmol/l-re csökkent ($p=0,01$), utóbbinál pedig a már kezdetben is alacsony (4,9 mmol/l) glükózsztint nem mutatott további változást ($p=0,67$). A középhosszú távú médiumoknál a 7. napig emelkedő átlagos glükózfelhalmozódást a 28. nap végéig folyamatos glükózfogyasztás követte. IMDM esetében a 7. napra 13,46 mmol/l-ről 23,55 mmol/l-re növekedett a glükózsztint ($p=0,01$), majd szintén folyamatos csökkenést mutatott 19,2 mmol/l-ig ($p=0,01$). Inosolnál az első 7 nap során az átlagos glükózsztint 13,9 mmol/l-ről 21,3 mmol/l-re növekedett ($p=0,01$), majd folyamatosan csökkent 14,2 mmol/l-re ($p=0,01$).

Az átlagos laktátsztint Optisol és Likorol esetében nagyon hasonlóan alakult. A kezdetben is igen alacsony érték (2,7 és 0,82 mmol/l) lassan és egyenletesen növekedett, a negyedik hét végére 3,64, illetve 4,2 mmol/l-t ért el ($p=0,012$ mindkét esetben).

IMDM esetében az átlagos laktátsztint kezdeti értéke (0,4 mmol/l) fokozatosan és jelentős mértékben emelkedett, a 4. hét végére 11,57 mmol/l-t ért el ($p=0,011$).



6. ábra. Inosolban konzervált cornea szöveti képe a vizsgálati periódus végén. Az endothelsejtekben jól láthatók a degenerációs vakuólomok (HE, 20x)

Inosol esetében a laktátfelhalmozódás hasonló volt az IMDM-éhez, az 1,3 mmol/l-es kezdeti érték a tartósítás 28. napjára 25,48 mmol/l-re emelkedett ($p=0,012$).

Hisztológiai vizsgálatok

A vizsgálati idő végén (28. nap) a négy tároló folyadékban konzervált corneák esetében mind fény-, mind elektronmikroszkóppal epitheliumvesztéset figyeltünk meg, a normálisan 6–8 soros hámborítás vagy teljesen hiányzott, vagy csak 1–2 rétegben maradt meg. A Bowman-membrán érintetlen volt. A stromalamellák megduzzadtak, a keratocyták száma csökkent. A Descemet-membrán ép volt. Az endothelsejtek megnyúltak, plazmájukban pedig degeneratív, vakuolizált szerkezet volt kimutatható (6. ábra).

Mikrobiológiai vizsgálatok

A vizsgálati idő tartama alatt mikrobiológiai fertőzés (bakteriális vagy gombafertőzés) egy esetben sem fordult elő.

Megbeszélés

Az elvégzett kísérletek szerint mind a négy konzerváló folyadék alkalmas corneakonzerválásra és alkalmas szaruhártyát biztosítani keratoplasztika elvégzéséhez.

A szaruhártya-átültetés eredménye a hibátlan műtéti technika mellett a recipiens szem állapotától, a donor korong vastagságától, görbületétől, érzékenységtől és nem utolsósorban az endothelsejtek számától függ.² Az endothelsejtszám természetesen függ a donor életkorától is: a szaruhártyadonorok esetében 3 évesnél fiatalabb donorok corneáját nem használjuk átültetésre a görbületi sugár változása miatt. Felső életkori korlátozások azonban nincsenek, jóllehet a donor kora nem független tényező: transzplantáció után az endothelsejtszám csökkenése nagyobb idősebb donorok szaruhártyáját használva.¹⁹ Konzervált szaruhártyák esetében (in vitro) azonban a donor kora nincs hatással az endotheliumsejtszám változására.²³ A tanulmá-

nyunkban vizsgált 32 cornea esetén a legalacsonyabb életkor 28 év, a legmagasabb 76 év volt, tehát szélsőséges korhatárok nem fordultak elő és nem találtunk szignifikáns korrelációt a kor és a kiindulási sejtszám között.

Vizsgálataink szerint a középtávú konzerváló médiumok esetében az endothelsejtszám folyamatosan szignifikánsan csökkent a 28 nap alatt Likorolban, 14 nap alatt pedig Optisolban. Optisol esetében 37,5%-os, Likorolnál 27,9%-os volt a sejtvészesség a második hét végére.

Irodalmi adatok alapján Optisol GS-ben tárolt corneák endothelsejtszáma 4 nap után 9,5%-kal, 21 nap után 16%-kal, majd 35–56 nap után több mint 50%-kal csökkent.¹⁵ A 67. nap után pedig 95–100%-os volt az endothelsejtvészesség.¹⁵ Más szerzők szerint Optisolban legalább 27 napig megőrződött az endothelfunkció (68% élő sejt).⁴ Ugyancsak az Optisol hatását elemezve a médiumban tárolt, majd beültetésre kerülő corneák endothelsejtszáma 3–6–12 hónap után is csak 5–11,5–15%-kal csökkent.^{12,13} Más adatok szerint Optisolban tárolt corneák esetében 6 hónappal a műtét után (átlagos konzerválási idő 70,8 óra) 30,1%-os volt az endothelsejtvészesség.²⁴ Saját méréseinkben Optisol esetében a második hétre 37,5%-kal csökkent az endothelsejtszám és patológiásan változott a sejtmorfológia, ami alapján mi a 2. hét előtt mindenképpen ajánljuk a szaruhártya felhasználását.

Likorol esetében irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Saját kísérletes adataink alapján azonban hasonló szempontok miatt itt is a 14 nap konzerválási idő előtti időszakban javasoljuk a szaruhártya beültetését.

Sejtenyészítő médiumokban konzervált corneák esetében Inosolnál 28,1%, IMDM-nél 24,7%-os sejtszámcsökkenést mutattunk ki, de csak a negyedik hét végén. Ezen adatok egyeznek azzal a megfigyeléssel, hogy szövetkultúrákban tárolt szaruhártyák esetében 35 napig nincs jelentős endothelsejtvészesség és ultrastrukturális károsodás.²⁰

Újabban a sejtenyészítő médiumokban történő corneakonzerválás időtartamát különböző faktorokkal (növekedési faktor, inzulin) igyekeznek négy hét fölé emelni.^{9,22} Ezen esetekben a konzerválás időtartama alatt (35,6±7 nap) az endothelsejtvészesség 10%-os volt. Az ötödik konzerválási hét után beültetett szaruhártyák átlagos endothelsejtszáma 2153±372/mm² volt 4 hónap, és 1854±390/mm² volt 12 hónap után.⁹

Ugyancsak sejtenyészítő oldatban (Modified Minimal Essential Medium-MMEM) 31 °C-on zárt rendszerben az endothelsejtszám 4 hét alatt 2963±58,7 sejt/mm²-ről 2649 sejt/mm²-re, 6 hét alatt 2087 sejt/mm²-re csökkent. A 6. hét eltelte után teljes endothelialis nekrozis következett be.²² Saját vizsgálataink szerint hasonlóan teljes endothelialis sejtpusztulást találtunk középtávú (Optisol, Likorol) és csoportos sejtnekrozist középhosszú távú (Inosol, IMDM) konzerválási módszereknél 4 hét eltelte után.

Posztoperatív eredményeket tekintve, öt évvel keratoplasztika után szövetkultúrát használva konzerváló médiumként az átlagos endothelsejtszám 1095±497 sejt/mm², nedves kamrában tárolt corneáknál pedig 1070±499 sejt/mm² volt. A számadatok között szignifikáns eltérés nem volt.¹⁰ Retrospektív tanulmányokban Inosol esetében az átlagos endothelsűrűség 1349 sejt/mm² volt a keratoplasztika utáni második évben, és ugyanakkor megál-

lapították, hogy a sejt kultúrák esetén az endothelsejtszám jóval kevésbé csökken.⁵

Meglepődve tapasztaltuk, hogy két esetben az átlagos sejtszám az idő előre haladtával nem csökkent, hanem – igaz csak kevéssel – nőtt (Optisol 14. nap 2500/mm², 21. nap 2520/mm², IMDM, 14. nap 3140/mm², 21. nap 3180/mm²). A méréseket a cornea centrális részén egy ugyanazon tapasztalt vizsgáló manuálisan végezte, így az eredmény mérései hibaként is elkönnyelhető, bár ez kevésbé valószínű. A konzerváló oldatok összetétele gyakorlatilag egy sejtenyészítő oldatnak felel meg. Az ilyen közegbe helyezett corneák endotheliumáról kimutatták, hogy megváltozik a fenotípusuk – típusos és fibroblastszerű endothelsejtek jelennek meg – és osztódási képességgel is bírnak.⁸ A tanulmánynak nem volt célja ennek megerősítése vagy bizonyítása, azonban az eltelt 21 nap alkalmas a sejtosztódás megindulására, ezért a fenti mechanizmust feltételezzük a történések hátterében.

A konzerváló folyadékok glükóz- és laktátszintje fontos és párhuzamos paramétere a cornea metabolikus aktivitásának nyomon követéséhez.²¹ Mind a négy konzerváló médium esetében a szöveti anyagcsere változását a glükóz- és a laktátszint monitorozásával követtük. Aerob körülmények közt a glükózfelhasználás, anaerob körülmények közt a laktátakkumuláció kerül előtérbe. A középtávú konzerváló szerek esetében nem volt számottevő sem a glükózfelhasználás, sem a laktátakkumuláció, bár Optisol esetében igen alacsony volt a glükózsztint már a kiinduláskor is. Az aerob és anaerob anyagcsere közötti egyensúly megőrzését feltehetően az alacsony tárolási hőmérséklet okozta (+4 °C). Középhosszú távú médiumok esetén az első hét végén csökkenésnek induló glükózfogyasztás összefüggést mutatott a laktát felhalmozódásával, ami jól jelzi az aerob és anaerob anyagcsere közti változást, illetve egyensúlyt. A laktátakkumuláció azonban endothelsejtvészést okoz a toxicitásának köszönhetően, és jóval kisebb volt a középtávú módszereknél, vagyis alacsony hőmérsékleten (+4 °C), mint a középhosszú távúaknál fiziológiás hőmérsékleten (+37 °C).

A szövettani vizsgálatok alapján mind a négy folyadék esetében a normálisan 6–8 rétegű epithelium sejtsorainak csökkenését vagy teljes hiányát és keratocytaszámcsökkenést találtunk. Ez megfelel az irodalmi adatoknak, ahol ezen eltéréseket ozmotikus változásokkal magyarázzák.⁷ Az endothelium rétegében észlelt elváltozások – a sejtek megnyúlása – pedig valószínűleg az élő endothelsejtek kompenzációjának felelnek meg.⁴ Optisolban tárolt corneák esetében az endothelialis ultrastuktúra 7 napig,¹³ más szerzők szerint 21 napig¹¹ ép maradt. Az intercelluláris kapcsolatok a 2. hétig intaktak maradhatnak.¹¹ Saját vizsgálatainkban az endothelsejtek degenerációját észleltük fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal mind a négy konzerváló médium esetében.

A 32 konzervált cornea esetében fertőzés egy esetben sem fordult elő, ami valószínűleg az oldatokban található antibiotikumoknak és antimikotikumoknak köszönhető (a Likorolban penicillin G, streptomycin, gentamycin, az Optisolban gentamycin, a középhosszú távú oldatokban pedig penicillin, streptomycin, valamint amphotericin B található).

A különböző konzerválási módszerek hosszú távú klinikai eredményei hasonlóak: 327 beteg többéves követése szerint a szövetkultúrában tartósított corneák hasonlóan jó posztoperatív eredményeket mutattak, mint a nedves kamrában tároltak.⁶ Tehát – más nagyszámú beteganyag adatai alapján is – a donor cornea konzerválási módszerének nincs kihatása a szaruhártya túlélésére.¹⁴

Összefoglalva a középtávú módszer (Optisol, Likorol) előnye az egyszerű előkészítés, a kisebb fertőzésveszély, a chondroitin-szulfát- és dextrántartalommal elkerülhető corneaduzzadás, valamint az, hogy az epithelium 5–7 napig ép marad. A középtávú módszer hátránya a kis anyagcsere-aktivitás, a rövid tárolási idő (maximum 10 nap), nem utolsósorban pedig az, hogy ezek a folyadékok drágák.

A középhosszú távú módszer (IMDM, Inosol) előnye a fiziológiás anyagcsere-aktivitás, a 2 héten túli konzerválási időtartam és a módszer olcsósága. Hátránya, hogy bonyolultabb előkészítést igényel, nagyobb a fertőzésveszély, a felhasználás előtt dehidráció szükséges, és az epithelium a 2. hét elejére legtöbbször leválik.

Saját szembankunk gyakorlata, ajánlása és kísérleteink eredménye alapján a néhány napra (átlagosan 7 nap) előre tervezett műtétek esetében a középtávú konzerváló oldatokat (Optisol, Likorol), a hosszabb távra (3 hét) előre tervezett műtétnek a sejtenyészítő médiumokat javasoljuk szaruhártya-tartósításhoz. Mindkét módszer esetében a cornea állapota és felhasználhatósága az endotheliumsejtszám alapján önmagában nem, csak a morfológiai szerkezettel együtt értékelhető.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény az Egészségügyi Tudományos Tanács támogatásával készült.

Irodalom

1. Allarkhia L., Robin S.M., Mindrup E.A., Lindstrom R.L.: Eye banking: The Minnesota experience. *Ann Ophthalmol* 22, 286–292 (1990).
2. Andersen J., Ehlers N.: Corneal transplantation using 4-week banked donor material. Long-term results. *Acta Ophthalmol* 65, 293–299 (1987).
3. Archer D.B., Trevor-Roper P. D.: Organization and administration of Westminster-Moorfields Eye-Bank. *Br J Ophthalmol* 51, 1–12 (1967).
4. Baumann G., Fries U., Schnaudigel O.E.: Viability of corneal endothelium after long term storage at +4 degrees C in Optisol. *Ophthalmologie* 91, 624–627 (1994).
5. Borderie V., Laroche L., Védie F., Lopez M.: Penetrating keratoplasty after graft preservation in organ culture at +37 degrees centigrade. 1-year results. *Fr J Ophthalmol* 18, 570–577 (1995).
6. Böhnke M.: Donor tissues for keratoplasty. Report of experiences by the Hamburg cornea bank. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 198, 562–571 (1991).
7. Campos M., Szerenyi K., Lee M., McDonnell J.M., Lopez P.M., McDonnell P.J.: Keratocyte loss after corneal deepithelization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol* 112, 254–260 (1994).
8. Engelmann K., Bednarz J., Böhnke M.: Endothelzell-transplantation und Wachstumsverhalten des humanen kornealen Endothels. *Ophthalmologie* 96, 555–562 (1999).
9. Frueh B.E., Böhnke M.: Corneal grafting of donor tissue preserved for longer than 4 weeks in organ-culture medium. *Cornea* 14, 463–466 (1995).
10. Hagenah M., Carstens D., Böhnke M., Winter R.: Development of endothelium cell density using fresh and organ cultured tissue 5 years after penetrating keratoplasty. *Ophthalmologie* 94, 90–93 (1997).
11. Kim K., Edelhauser H.F., Holley G.P., Geroski G.H., Lynn M., Walsh G.E.: Optisol stored corneal endothelial permeability. *Am J Ophthalmol* 117, 385–393 (1994).
12. Less J.H., Bourne W.M., Musch D.C., Sugar A., Gordon J.F., Reinhart W.J., Meyer R.F., Patel D.I., Bruner W.E., Cano D.B.: A randomized, prospective, double-masked clinical trial of Optisol vs DexSol corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 110, 1404–1408 (1992).
13. Lindstrom R.L., Kaufman H.E., Skelniek D.L., Laing R.A., Lass J.H., Musch D.C., Trousdale M.D., Reinhart W.J., Burris T.E., Sugar A.: Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol*, 114, 345–56 (1992).
14. Maguire M.G., Stark W.J., Gottsch J.D., Stulting R.D., Sugar A., Fink N.E., Schwartz A.: Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 101, 1536–1547 (1994).
15. Means T.L., Geroski D.H., Hadley A., Lynn M.J., Edelhauser H.F.: Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol* 113, 805–809 (1995).
16. Módis L., Berta A.: Szaruhártya-átültetés és corneakonzerválás. *Háziorvos Továbbképző Szemle* 3, 59–61 (1998).
17. Módis L., Boytha Zs., Berta A.: A corneakonzerválás módszertani kérdései. *Szemészet* 137, 109–111 (2000).
18. Módis L., Szalka A., Berta A., Takács L., Balázs K., Nagy A.: A Debreceni Szembank. *Szemészet* 132, 141–143 (1995).
19. Musch D.C., Meyer R.F., Sugar A.: Predictive factors for endothelial cell loss after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 111, 80–83 (1993).
20. Pels L., Schuchard Y.: Organ culture and endothelial evaluation as a preservation method for human corneas. In: Brightbill F. S., ed. *Corneal Surgery*. Mosby Co, St. Louis, Mo 93–102 (1986).
21. Redbrake C., Frantz A., Salla S.: Korrelation zwischen Glucose- und Laktatkonzentrationen in der humanen Hornhaut und im Organkulturmédium. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 213, 93–96 (1998).
22. Redbrake C., Salla S., Frantz A.: Changes in human donor corneas preserved for longer than 4 weeks. *Cornea* 17, 62–65 (1998).
23. Senoo T., Joyce N.C.: Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 660–667 (2000).
24. Shimazaki J., Yamada M., Tsubota K.: Corneal transplantation with donor corneas stored in moist chamber and chondroitin sulfate-containing medium. *Cornea* 12, 104–108 (1993).
25. Stocker F.W., King E.H., Lucas D.O., Georgiade N.A.: Clinical test for evaluating donor corneas. *Arch Ophthalmol* 84, 2–7 (1970).

A szerző levelezési címe: Dr. Módis László

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Szemészeti Klinika
4012 Debrecen, Nagyerdei körút 98.

E-mail: lmodis@dragon.klte.hu