

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Hornhautgewebe

Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurden Schweineaugen verwendet. Schweineaugen sind gegenüber dem Gefriertrauma empfindlicher als menschliche Hornhäute und können als Modell für die experimentelle Kryokonservierung verwendet werden.<sup>68</sup> Die Zulassung für die Verwendung von Tierkörperteilen zu wissenschaftlichen Forschungszwecken wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 12.06.98 erteilt. Die Augen stammten aus gewerblicher Schlachtung von Schweinen der Rassen Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse, Duroc und Hampshire. Das Alter der Schweine zum Zeitpunkt der Schlachtung betrug im Mittel 168 Tage. Die Enukleation erfolgte stets vor der thermischen Behandlung der Schweine und wurde durch den Schlachter ausgeführt. Direkt im Anschluß an die Enukleation wurden die Schweineaugen in einer feuchten Kammer (verschließbare Plastikschale mit angefeuchteter Zellstoffeinlage) bei 4° Celsius aufbewahrt. Der Transport vom Schlachthof zum Labor dauerte maximal 30 Minuten und erfolgte ebenfalls in einer feuchten Kammer, die mit Eis gekühlt wurde.

### 2.2 Präparation der Hornhautlamellen

Die Präparation der Hornhäute erfolgte bei allen Augen spätestens neun Stunden nach der Enukleation. Schweineaugen mit pathologischen Befunden des vorderen Augenabschnitts wurden nach makroskopischer Betrachtung von den Versuchen ausgeschlossen. Die Entfernung der Adnexe und die Desinfektion der Bulbi erfolgte unmittelbar vor der Präparation. Die Augen wurden nach folgendem Schema desinfiziert:

- dreimalige Spülung in 0.9% NaCl-Lösung für je 30 Sekunden
- einmalige Spülung in 0.7% PVP-Jodlösung für 90 Sekunden
- Umsetzung des PVP-Jods in 0.1% Natriumthiosulfatlösung
- Spülung und Aufbewahrung bis zur Präparation in 0.9% NaCl-Lösung

Die Präparation der Bulbi erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Laminar-Airflow-Werkbank. Zunächst wurde die Konjunktiva mittels Schere bis zum Limbus hin entfernt. Um die Handhabung des Bulbus zu verbessern, wurde dieser in eine sterile Komresse gewickelt. Mit Hilfe des Berlin-Mikrokeratoms 014 wurde im zentralen Bereich der Hornhaut eine vordere Hornhautlamelle abgetragen und verworfen. 2 mm vom Limbus entfernt wurde die Sklera mittels eines spitzen Skalpells zirkulär inzidiert.



**Abbildung 4** Das Präparationsbesteck bestehend aus Komresse(1), Schere(2), Iris-Pinzette(3), Kolibri-Pinzette(4), Keratoplastik-Siebspatel(5), spitzem Skalpell(6), Hornhautstanze nach Polack(7), Mikrokeratom(8)

Da sich die Korneoskleralscheibe beim Schweineauge, im Gegensatz zum menschlichen Auge, in diesem Zustand nicht leicht von der Aderhaut trennen ließ, wurde die Aderhaut mittels Schere durchtrennt. Die noch mit Iris und Linse zusammenhängende Korneoskleralscheibe konnte nun mit der Hornhautseite nach unten weisend abgelegt werden. Mit einer Kolibri- und Irispinzette wurde vorsichtig die Iris mit anhängender Linse von der Korneoskleralscheibe gelöst. Die auf diese Weise gewonnene Korneoskleralscheibe wurde mit dem Endothel nach oben weisend in eine Hornhautstanze gelegt. Aus dem

verjüngten Hornhautbereich wurde ein 7,5 mm großes Trepanat herausgeschnitten. Die präparierte hintere Hornhautlamelle wurde wiederum mit dem Endothel nach oben weisend in eine Zellkulturplatte überführt, die 10 ml CPTES (corneal-potassium-TES) enthielt.

## 2.3 Das Berlin-Mikrokeratom

Beim Berlin-Mikrokeratom handelt es sich um ein von F. Hoffmann und K. Jessen 1985 vorgestelltes Mikrokeratom für die lamellierende refraktive Hornhautchirurgie.<sup>69</sup>

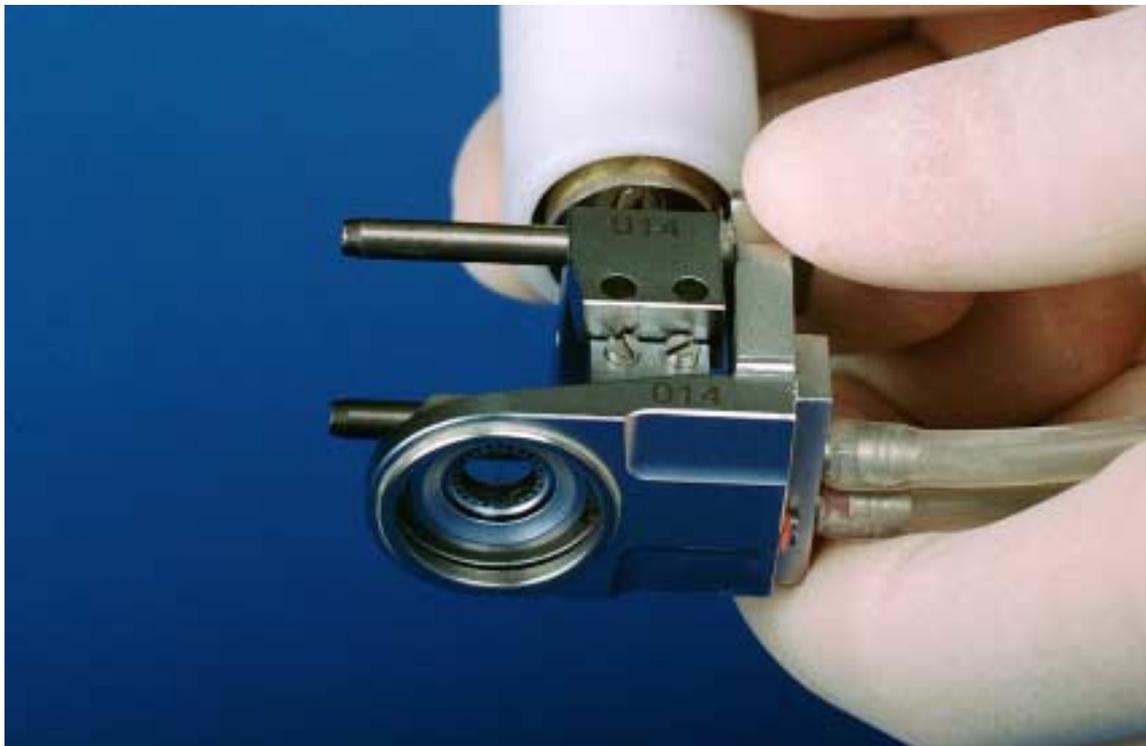


**Abbildung 5** Das Berlin-Mikrokeratom; dargestellt sind die Basisplatte und der Messerschlitten in der Ansicht von unten; an der Basisplatte sind das zentrale Glasfenster sowie der innere und äußere Saugring zu erkennen.

Das Mikrokeratom (Abb. 5 und 6) besteht aus vier Teilen:

- Basisplatte
- Motor
- Messerschlitten
- Vakuumpumpe

Die dem Auge aufzusetzende Basisplatte besitzt zwei Saugringe. Hierbei dient der innere Saugring dem Ansaugen der Hornhaut und zur Stabilisierung des Schnittes. Der äußere Saugring fixiert das Auge am Limbus und erzeugt die notwendige feste Verbindung zwischen Mikrokeratom und Auge. Bewegungen des Auges, die zu Schnittfehlern führen können, werden damit unterbunden. Über zwei Schläuche wird von einer Vakuumpumpe der für beide Saugringe jeweils optimale Unterdruck (-0,8 bis -1,0 bar) erzeugt. Im Zentrum beider Saugringe ermöglicht ein Glasfenster die exakte Positionierung des Mikrokeratoms auf der Hornhautoberfläche.



**Abbildung 6** Das Berlin-Mikrokeratom in der Ansicht von schräg unten; der Messerschlitten wird auf die zylinderförmigen Führungsschienen der Basisplatte aufgesetzt; zu erkennen sind auch der den Messerschlitten antreibende Elektromotor, wie auch die beiden den Unterdruck übertragenden Schläuche.

Die Hornhaut wird während des Ansaugvorganges durch Anpressen der Glasplatte des Mikrokeratoms abgeflacht. An der Basisplatte wird über zwei zylinderförmige Führungsschienen der Messerschlitten befestigt, dessen oszillierendes Messer parallel zur

Schnittfläche liegt. Über einen Elektromotor, der wie auch die Saugvorrichtung über ein Fußpedal bedient wird, wird ein Exzenter angetrieben, der das Messer in Bezug auf die Schlittenbewegung transversal bewegt. Das Messer oszilliert mit einer Frequenz von 1750 Umdrehungen/min. und ist aus Saphir-Glas. Dieses ist um den Faktor zehn härter als Edelstahl und erzeugt damit wesentlich bessere Schnittergebnisse. Auch die Geometrie der Klinge wurde dahingehend optimiert, möglichst glatte Schnittflächen zu erhalten.<sup>70</sup> Mit Hilfe des Berlin-Mikrokeratoms ist es möglich, ohne das Endothel zu schädigen, im Zentrum der Hornhaut eine Lamelle mit einer Dicke von 350 µm und einem Durchmesser von 8,5 mm abzutrennen.

Da neben der Keratokyphose und der LASIK (laser stromal keratomileusis) ein Einsatz des Berlin-Mikrokeratoms auch zum Zwecke der hinteren lämellären Keratoplastik möglich ist, diente es in dieser Arbeit zur Gewinnung der hinteren Hornhautlamellen.

## 2.4 Vitrifikationsmedium

In der vorliegenden Studie wurde eine von Fahy entwickelte und von Bourne<sup>46</sup> modifizierte Vitrifikationslösung (VS41a) verwendet.

Tabelle 2.1 Ansatz für 100 ml der Vitrifikationslösung VS41a

Substanz	Anbieter und Bestell-Nr.:	Menge
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Kat.-Nr. D8779	22,00 ml (3,1 mol/l)
1,2-Propandiol	Sigma Kat.-Nr. P6209	16,20 ml (2,2 mol/l)
Formamid	Sigma Kat.-Nr. F7503	12,40 ml (3,1 mol/l)
Corneal-PotassiumTES (CPTES) mit <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chondroitinsulfat A (25,000g/l) <sup>1)</sup></li> <li>• NaHCO<sub>3</sub> (0,520 g/l)</li> <li>• NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,156 g/l)</li> <li>• MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,192 g/l)</li> <li>• Glucose (0,901 g/l)</li> <li>• TES (22,920 g/l) <sup>2)</sup></li> <li>• KOH 1N (100 ml)</li> <li>• HCl 1N (30ml)</li> </ul>	Apotheke Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin	49,40 ml
<sup>1)</sup> Chondroitinsulfat A (ChS); Sigma Kat.-Nr. C8529 <sup>2)</sup> TES: N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethan-sulphon-Säure; Sigma Kat.-Nr. T1375		

Eigenschaften der Vitrifikationslösung VS41a wurden von Mehl beschrieben. Danach liegt die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) für VS41a bei  $-123^\circ\text{C}$ . Zur Bildung von Kristallkeimen kommt es bei Temperaturen unter  $-90^\circ\text{C}$ .<sup>71</sup> Als Basismedium für die Vitrifikationslösung diente CPTES (Corneal-Potassium-TES), eine kaliumreiche Elektrolytlösung, die den nicht zellgängigen anionischen pH-Puffer N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethan-sulphon-Säure (TES) enthält. Dem CPTES wurde 2,5% Chondroitinsulfat (Typ A) zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

## 2.5 Einschleusung des Vitrifikationsmediums

Die Lamellen, die nach der Präparation zunächst in reiner CPTES-Lösung für maximal 15 Minuten auf Eis gelagert wurden, wurden anschließend in 3er Gruppen der Lösung VS41a ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurden sie mittels eines Siebspatels aus der CPTES-Lösung herausgenommen und auf einen speziell angefertigten Lamellenträger gelegt (Abb. 7). Auf diesem verbleibend konnten die Lamellen in die unterschiedlich konzentrierten VS41a-Lösungen in einer 6-Loch-Kulturplatte nacheinander eingebracht werden. Hierdurch wurde eine erneute mechanische Belastung der Hornhautlamellen vermieden. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Lösungen wurden durch Verdünnung mit CPTES hergestellt. Da VS41a schwefelhaltige und möglicherweise instabile Verbindungen enthält, wurden die Lösungen unmittelbar vor der Präparation angesetzt, um deren gleichbleibende Qualität sicherzustellen. Die Lösungen wurden nach gründlichem Vermischen steril filtriert. Für alle Konzentrationsstufen wurden 10 ml Medium verwendet.

Die Einschleusung des Vitrifikationsmediums erfolgte in drei unterschiedlichen Modifikationen, wobei die Temperatur der Lösungen, die durchlaufenen Konzentrationsstufen und die Verweildauer der Hornhautlamellen in den Lösungen verändert wurden. Genaue Angaben über die verschiedenen Einschleusungsverfahren sind den Tabellen 2.2 bis 2.4 zu entnehmen.



**Abbildung 7** Einschleusung des Vitrifikationsmediums; mit Hilfe eines Siebspatels wird die Hornhautlamelle auf den Lamellenträger gelegt; der Lamellenträger ermöglicht das Eintauchen der Hornhautlamellen in die unterschiedlich konzentrierten Vitrifikationslösungen unter Vermeidung einer mechanischen Belastung (zur besseren Anschaulichkeit wurde für die Demonstration eine getriebte Hornhautlamelle verwendet).

**Tabelle 2.2** Protokoll der Einschleusung nach Bourne <sup>46</sup>

Schritt	Konzentration	Temperatur	Sucrosezusatz	Dauer
1.	6% VS41A	0°C	Ø Sucrose	10 min.
2.	24% VS41A	0°C	Ø Sucrose	10 min.
3.	60% VS41A	0°C	Ø Sucrose	10 min.
4.	100% VS41A	0°C	Ø Sucrose	10 min.
jeweils in einem Volumen von 10 ml				

**Tabelle 2.3** Protokoll der Einschleusung nach eigenen Überlegungen

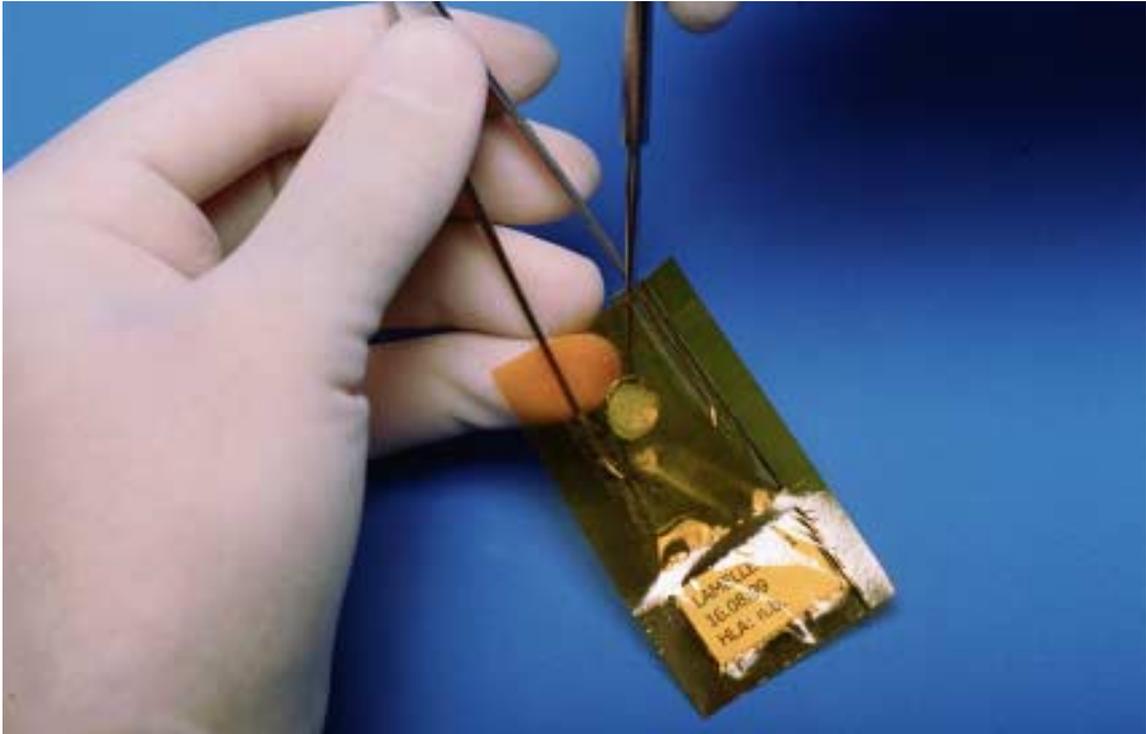
Schritt	Konzentration	Temperatur	Sucrosezusatz	Dauer
1.	24% VS41A	0°C	Ø Sucrose	5 min.
2.	60% VS41A	0°C	Ø Sucrose	5 min.
3.	100% VS41A	0°C	Ø Sucrose	12 min.
jeweils in einem Volumen von 10 ml				

**Tabelle 2.4** Protokoll der Einschleusung nach Angaben von Wusteman <sup>47</sup>

Schritt	Konzentration	Temperatur	Sucrosezusatz	Dauer
1.	6% VS41A	21,5°C	Ø Sucrose	5 min.
2.	24% VS41A	21,5°C	Ø Sucrose	5 min.
3.	60% VS41A	21,5°C	Ø Sucrose	5 min.
4.	100% VS41A	21,5°C	Ø Sucrose	5 min.
jeweils in einem Volumen von 10 ml				

## 2.6 Der Gefriergutbehälter

Wir verwendeten für die Gefrierkonservierung, nach anfänglichen unbefriedigenden Ergebnissen mit anderen Gefriergutbehältern aus Kupfer, die von der American Fluoroseal Corporation hergestellten Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouches“. Diese Beutel besitzen einen zweischichtigen Wandaufbau. Die Außenseite besteht aus einem 0,025mm starken Film aus Kapton<sup>®</sup> und ist beschriftbar. Für die Innenseite wurde hingegen Teflon<sup>®</sup>, ebenfalls in einer Stärke von 0,025mm, verwendet. Teflon<sup>®</sup> ist sehr inert und verhindert eine Adsorption, wie auch eine Adhäsion. Beide Materialien bleiben in flüssigem Stickstoff flexibel und sind transparent, wodurch eine Betrachtung des Gefriergutes während des Einfrierens und Auftauens möglich ist.



**Abbildung 8** Zunächst werden 0,1 ml der Vitrifikationslösung in den Kapton®/Teflon® „Peel Pouch“ pipetiert; bevor die Lamelle mit Hilfe des Siebpatels in den Beutel eingelegt wird, wird dessen Öffnung mit einer Pinzette aufgespreizt.

Die Beutel sind unter sterilen Bedingungen verschweißt und müssen vor Gebrauch an einem Ende aufgeschnitten werden. Für unsere Zwecke wurden Beutel mit einer Kammergröße von 2,4×2,4 cm verwendet. Zunächst wurden mittels einer Eppendorf-Pipette 0,1 ml der 100%igen Vitrifikationslösung eingebracht. Die Beutel wurden bis zum Einlegen der Hornhautlamellen auf Eis gelagert. Das Einlegen der Hornhautlamellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Siebpatels. Um dabei den Kontakt zwischen Endothel und der Innenseite des Kapton®/Teflon® „Peel Pouch“ zu verhindern, wurde die Beutelöffnung durch eine Pinzette aufgespreizt (Abb. 8). Nach Einlegen der Hornhautlamelle wurde der Kapton®/Teflon® „Peel Pouch“ dann mit einem Schweißgerät (335°C) wieder verschlossen.

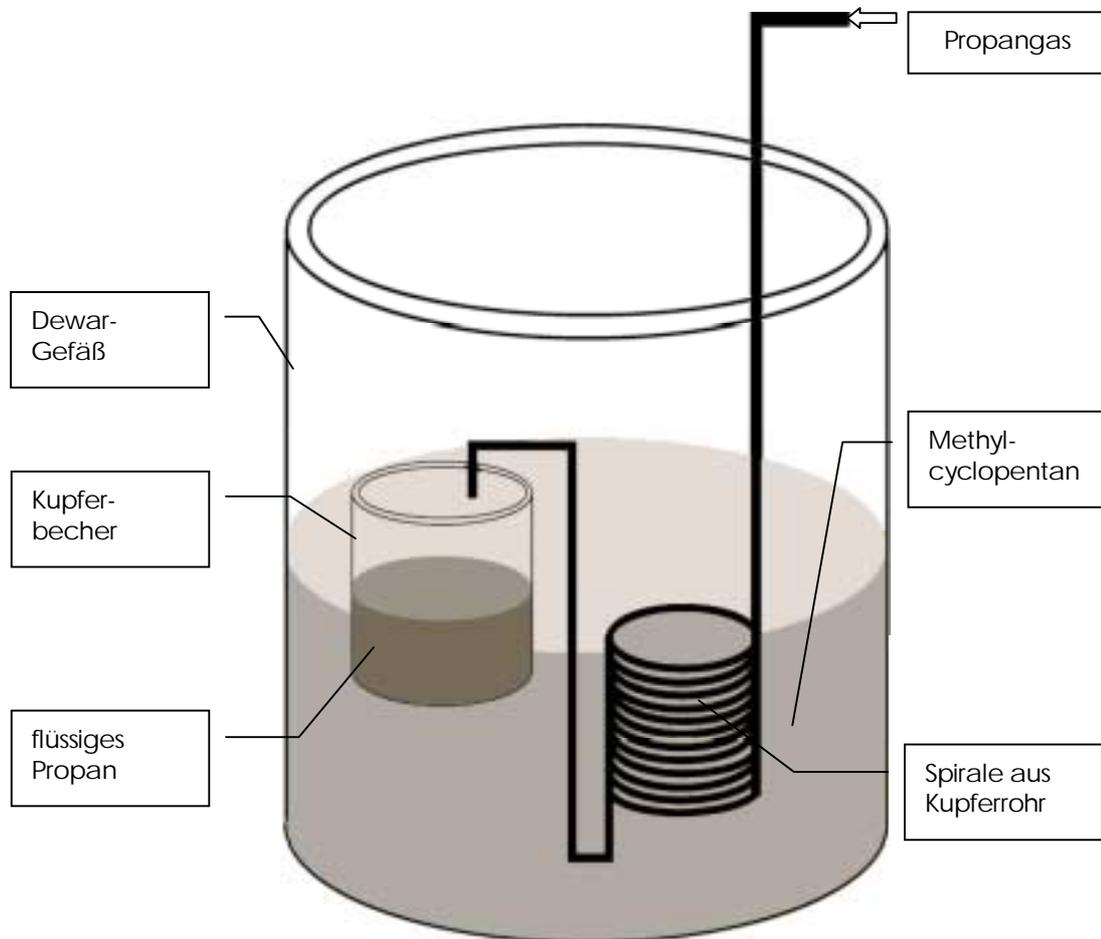
## 2.7 Das Vitrifikationsverfahren

Die Abkühlung der im Gefriergutbehälter befindlichen Hornhautlamelle erfolgte schrittweise. Im ersten Schritt wurde die Lamelle mit maximaler Kühlrate auf  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Um diesen Einfrierschritt realisieren zu können wurde die in der Abbildung 9 dargestellte Einfriervorrichtung entwickelt.

Danach vollzog sich der Einfriervorgang wie folgt: Zunächst wurde das in einem Dewar-Gefäß befindliche Methylcyclopentan unter Verwendung flüssigen Stickstoffs auf  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. In das abgekühlte Methylcyclopentan wurde dann ein spiralförmig gebogenes Kupferrohr gehängt, dessen eines Ende an eine Propangasflasche angeschlossen wurde und dessen anderes Ende in einem Kupferbecher mündete, der im Methylcyclopentan-Bad hing. Über das Kupferrohr wurde nun Propangas eingeleitet, das während der Passage der Kupferspirale auf  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und auf diese Weise verflüssigt wurde. Das flüssige,  $-140^{\circ}\text{C}$  kalte Propan wurde am Ende des Kupferrohres im Kupferbecher aufgefangen. Durch Eintauchen des Gefriergutbehälters in das Propan wurde die Hornhautlamelle im ersten Schritt auf eine Temperatur von  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt.

Tabelle 2.5 Übersicht über vorgenommene Einfriervorgänge

Schritt	Temperaturbereich	Kühl-/ Aufwärmrate	Einfriervorrichtung
1	$0^{\circ}\text{C}$ bis $-140^{\circ}\text{C}$	$\gg 200^{\circ}\text{C}/\text{min}$	in Methylcyclopentan gekühltes Propan
2	$-140^{\circ}\text{C}$ bis $-150^{\circ}\text{C}$	$2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	programmierbarer Einfrierautomat Cryoson BV-10
3	$-150^{\circ}\text{C}$	konstant für 10 min.	programmierbarer Einfrierautomat Cryoson BV-10
4	$-150^{\circ}\text{C}$ bis $-179^{\circ}\text{C}$	$2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	programmierbarer Einfrierautomat Cryoson BV-10
5	$-180^{\circ}\text{C}$ bis $-196^{\circ}\text{C}$	nicht bestimmt	flüssiger Stickstoff



**Abbildung 9** Einfriervorrichtung für die Vitrifikation von Hornhautlamellen; über eine Kupferspirale eingeleitetes Propangas wird in einem Bad aus Methylcyclopentan auf  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, dadurch verflüssigt und in einem Kupferbecher aufgefangen. Durch Eintauchen des Kapton®/Teflon® „Peel Pouches“ in das flüssige Propan wurde die Lamelle abgekühlt.

Die weitere Temperaturabsenkung bis  $-179^{\circ}\text{C}$  erfolgte mit einer Kühlrate von  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Zur Aushärtung des Glases wurde die Temperatur bei  $-150^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten konstant gehalten. Für die stufenweise Temperaturabsenkung in diesem zweiten Schritt wurde ein programmierbarer Einfrierautomat (Cryoson BV-10) eingesetzt. Die tiefste Temperatur, die mit diesem Einfrierautomaten erreicht werden konnte, lag bei  $-179^{\circ}\text{C}$ .

Nach Erreichen dieser Temperatur von  $-179^{\circ}\text{C}$  wurde das Gefriergut direkt in flüssigen Stickstoff eingebracht und bei  $-196^{\circ}\text{C}$  für 48 Stunden gelagert.

Die einzelnen Schritte des Einfriervorganges sind nochmals in Tabelle 2.5 zusammengefaßt.

## 2.8 Das Auftauverfahren

In einem ersten Schritt wurde das Gefriergut nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff langsam erwärmt. Diese langsame Erwärmung erfolgte in einem Temperaturbereich zwischen  $-196^{\circ}\text{C}$  und  $-140^{\circ}\text{C}$  mit einer Aufwärmrate von  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , die mit dem programmierbaren Einfrierautomaten (Cryoson BV-10) erzeugt wurde. Für den zweiten Schritt des Erwärmens bis zum Schmelzen des Gefriergutes wurde ein  $40^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad verwendet (Tab. 2.6). Das 1,5 Liter fassende Wasserbad wurde mit Hilfe einer Schwenkvorrichtung in Bewegung gehalten, um einen verbesserten Wärmeaustausch zwischen dem Gefriergut und dem Wasser zu erreichen. Der Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouch“ wurde während des Eintauchens in das Wasserbad nicht bewegt.

Tabelle 2.6 Übersicht über vorgenommene Auftauvorgänge

Schritt	Temperaturbereich	Kühl-/ Aufwärmrate	Auftauvorrichtung
1	$-196^{\circ}\text{C}$ bis $-140^{\circ}\text{C}$	$2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	programmierbarer Einfrierautomat Cryoson BV-10
2	$-140^{\circ}\text{C}$ bis $+40^{\circ}\text{C}$	ca. $3060^{\circ}\text{C}/\text{min}$	bewegtes Wasserbad ( $40^{\circ}\text{C}$ )

## 2.9 Ausschleusung des Vitrifikationsmediums

Die Ausschleusung erfolgte entsprechend dem Verfahren bei der Einschleusung. Im Unterschied zur Einschleusung erfolgte die Ausschleusung unter Zusatz von Sucrose, um die Endothelzellen vor einer osmotischen Schädigung zu schützen. Die Lamellen die nach den in Tabelle 2.2 und 2.3 gezeigten Schemata behandelt worden waren, wurden entsprechend der Tabelle 2.7 vom Gefrierschutzmittel befreit.

**Tabelle 2.7** Protokoll der Ausschleusung des Kryoprotektors nach Bourne<sup>46</sup>

Schritt	Konzentration	Temperatur	Sucrosezusatz	Dauer
1.	60% VS41A	0°C	0,5M Sucrose	10 min.
2.	24% VS41A	0°C	0,5M Sucrose	10 min.
3.	6% VS41A	0°C	0,5M Sucrose	10 min.
4.	0% VS41A	0°C	0,5M Sucrose	10 min.
5.	0% VS41A	0°C	Ø Sucrose	10 min.
jeweils in einem Volumen von 10 ml				

Die Lamellen, bei denen bereits die Einschleusung bei Raumtemperatur stattgefunden hatte (Tab. 2.4) erfolgte auch die Ausschleusung bei dieser Temperatur (Tab. 2.8).

**Tabelle 2.8** Protokoll der Ausschleusung nach Angaben von Wusteman<sup>47</sup>

Schritt	Konzentration	Temperatur	Sucrosezusatz	Dauer
1.	60% VS41A	21,5°C	0,5M Sucrose	3 min.
2.	24% VS41A	21,5°C	0,5M Sucrose	3 min.
3.	6% VS41A	21,5°C	0,5M Sucrose	3 min.
4.	0% VS41A	21,5°C	0,5M Sucrose	3 min.
5.	0% VS41A	21,5°C	Ø Sucrose	3 min.
jeweils in einem Volumen von 10 ml				

## 2.10 Die Organkultur

Nach erfolgter Ausschleusung der Vitrifikationslösung aus dem Hornhautgewebe wurden die Hornhautlamellen 24 Stunden organkultiviert. Das verwendete Organkulturmedium wurde entsprechend den Angaben in der Tabelle 2.9 hergestellt.

Die Substanzen wurden in einem sterilen Becherglas mit Hilfe eines Magnetrührers für einige Minuten gemischt und anschließend steril filtriert. Bei Raumtemperatur betrug der pH-Wert direkt nach Ansetzen des Mediums 7,0 und die Osmolarität des Mediums

lag bei 290 mosmol. Das so hergestellte Medium entspricht in modifizierter Form dem Organkulturmedium, das Sperling bei seinen Untersuchungen zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten eingesetzt hat.<sup>72</sup>

**Tabelle 2.9** Zusammensetzung des Organkulturmediums

Substanz	Anbieter und Bestell-Nr.:	Menge
Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen mit 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> <sup>1)</sup> mit stabilem Glutamin <sup>2)</sup>	Biochrom KG Seromed®; Kat.Nr. FG0325	88 ml
Penicillin/Streptomycin 10000 IE/10000 µg/ml	Biochrom KG Seromed®; Kat.Nr. A2212	1 ml
Amphotericin B	Biochrom KG Seromed®; Kat.Nr. A2612	1 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG Seromed®; Kat.Nr. S0113	10 ml
<sup>1)</sup> bei einem erwünschten pH-Wert von 7,3 und einem NaHCO <sub>3</sub> -Gehalt von 2,2 g/l ist die Begasung mit 7,0% CO <sub>2</sub> im Brutschrank erforderlich  <sup>2)</sup> das Medium enthält N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (ac-Ala-Gln) und ist daher bei +2 bis +8°C stabil		

Jeweils 10 ml des Mediums wurden in die Kammern einer 6-Loch-Kulturplatte pipetiert. Nach dem Einlegen der Hornhautlamellen in jeweils eine dieser Kammer, wurden die Lamellen in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 31°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 7% inkubiert. Direkt im Anschluß an die 24 stündige Organkultur wurden die Lamellen zum Zwecke der lichtmikroskopischen Befundung gefärbt.

## 2.11 Die Vitalfärbung

Als Qualitätskontrolle für die angewandte Gefriertechnik wurde die Vitalfärbung mit den Farbstoffen Alizarinrot S und Trypanblau gewählt, nachdem sich der Einsatz eines Phasenkontrastmikroskopes als alleinige Untersuchungstechnik als ungeeignet erwiesen

hatte. Die Doppelfärbung mit Trypanblau und Alizarinrot ermöglicht die morphologische Befundung und Vitalitätsbestimmung des gesamten kornealen Endothels. Die alleinige Färbung mit Trypanblau sorgt bei normalen Zellen für schwach erkennbare Zellgrenzen und Zellkerne. Geschädigte Zellen zeigen hingegen ein blau gefärbtes Zytoplasma und tief blau gefärbte Zellkerne. In Arealen schwer geschädigter und daher abgestoßener Zellen wird die Descemet-Membran blau gefärbt. Dabei zeigen sich bei mechanischer Beanspruchung lineare und halbkreisförmige Muster. Alizarinrot hingegen hat eine besonders hohe Affinität zu der Interzellularsubstanz und den Zellwänden. Die Anfärbung dieser Strukturen beruht auf einer pH-Wert beeinflussten Reaktion des Farbstoffes mit interzellulärem Calcium.<sup>1</sup> Im Gegensatz zu Trypanblau sollte Alizarinrot nur für experimentelle Zwecke und nicht zur Befundung des Hornhautendothels vor Keratoplastiken eingesetzt werden, da es sich gegenüber dem Endothel toxisch verhält.<sup>73</sup> Die Färbung erfolgte nach dem in Tabelle 2.10 zusammengefaßten Schema.

Trypanblau wird von der Firma Biochrom als fertige Lösung angeboten. Für den Ansatz des Alizarinrots mußten hingegen 200 mg Farbpulver in 100 ml 0,9%iger NaCl-Lösung mittels Magnetrührer gelöst werden. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 0,1%iger Ammoniaklösung.

Das in der Farbstofflösung enthaltene Sediment wurde vor dem Einsatz des Alizarinrots durch Filtration entfernt. Es erwies sich als notwendig den Alizarin-Farbstoff im Abstand von vier Wochen neu anzusetzen, da die notwendigen mehrmaligen pH-Einstellungen das Färbeverhalten des Farbstoffes veränderten.

Die Lamelle wurde mit dem Endothel nach oben zeigend auf einen Siebspatel gelegt. Mittels Glaspipette wurde jeweils ein Tropfen Trypanblau bzw. Alizarinrot auf die Endotheloberfläche appliziert. Nach der angegebenen Einwirkzeit wurde die Lamelle auf dem Siebspatel verbleibend in einem Bad aus 0,9% NaCl-Lösung gespült.

Beim Färben mit Alizarinrot kann es zur Ablagerung von Präzipitaten kommen, die leicht und schonend mit 0,9%iger NaCl-Lösung durch einen feinen Strahl abgespritzt werden können. Dabei kann es, vor allem bei zu saurem pH-Wert und einer zu langen Exposition gegenüber dem Farbstoff, zur flächenhaften Zellablösung kommen.

Tabelle 2.10 Vitalfärbung des Hornhautendothels

	Konzentration	Dauer	pH-Wert
Trypanblau	0.5% (Biochrom KG Kat.-Nr. L6323)	1 Minute	
Spülung	0,9%ige NaCl-Lösung	20 Sekunden	
Alizarinrot	0.2%; 200 mg Alizarinrot-Farbpulver (Chroma Kat.-Nr. 1F583) gelöst in 100 ml 0,9%iger NaCl-Lösung	4 Minuten	4.2
Spülung	0,9%ige NaCl-Lösung	20 Sekunden	

## 2.12 Fotodokumentation und Endothelzellanalyse

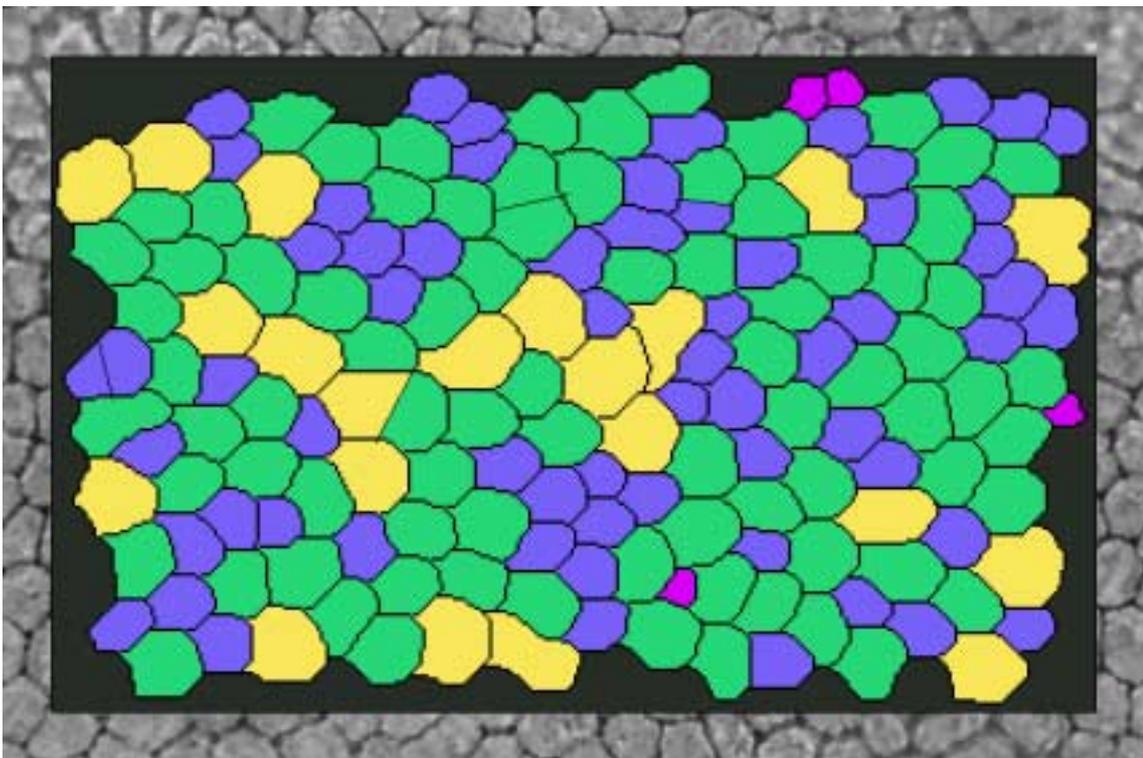
Die Hornhautlamellen wurden unverzüglich nach erfolgter Färbung mit der Endothelseite nach untenweisend auf einen Objektträger gelegt. Auf diese Weise wurde erreicht, daß das nur etwa 4 µm dicke Endothel in einer Ebene zu liegen kam und so spiegelmikroskopisch leichter untersucht werden konnte. Für die Betrachtung und Fotografie wurde ein inverses Forschungsmikroskop (Olympus IMT-2) verwendet. Dadurch war es möglich das Endothel von unten her zu betrachten, wobei sich zwischen Objektiv und Endothel nur der Objektträger befand.

Durch die angeschlossene Kamera (Olympus OM-4Ti) war es möglich, je ein Foto vom Zentrum und dem 1.-4. Quadranten der Hornhautlamelle zu erstellen. Für die Aufnahmen wurde ein Abbildungsmaßstab von 1:400 gewählt. Als Filmmaterial wurde der Diafilm Kodak Ektachrome 64T verwendet.

Im Anschluß an die Endothelmikroskopie wurde das Endothel der Hornhautlamellen noch makroskopisch mit einer 31-fachen Vergrößerung fotografiert (Fotoautomat Wild MPS 45). Aufgrund der Verteilung der mit Alizarinrot bzw. Trypanblau angefärbten Areale konnte mit Hilfe eines Zählnetzes bestimmt werden, wieviel Prozent der Endothelfläche noch vital bzw. geschädigt war. Danach wurden die Hornhautlamellen verworfen.

Die mikroskopischen Aufnahmen des Hornhautendothels wurden durch die Fotoabteilung des Universitätsklinikums Benjamin Franklin eingescannt, digitalisiert und auf einem digitalen Datenträger gespeichert. Die nun in digitaler Form vorliegenden

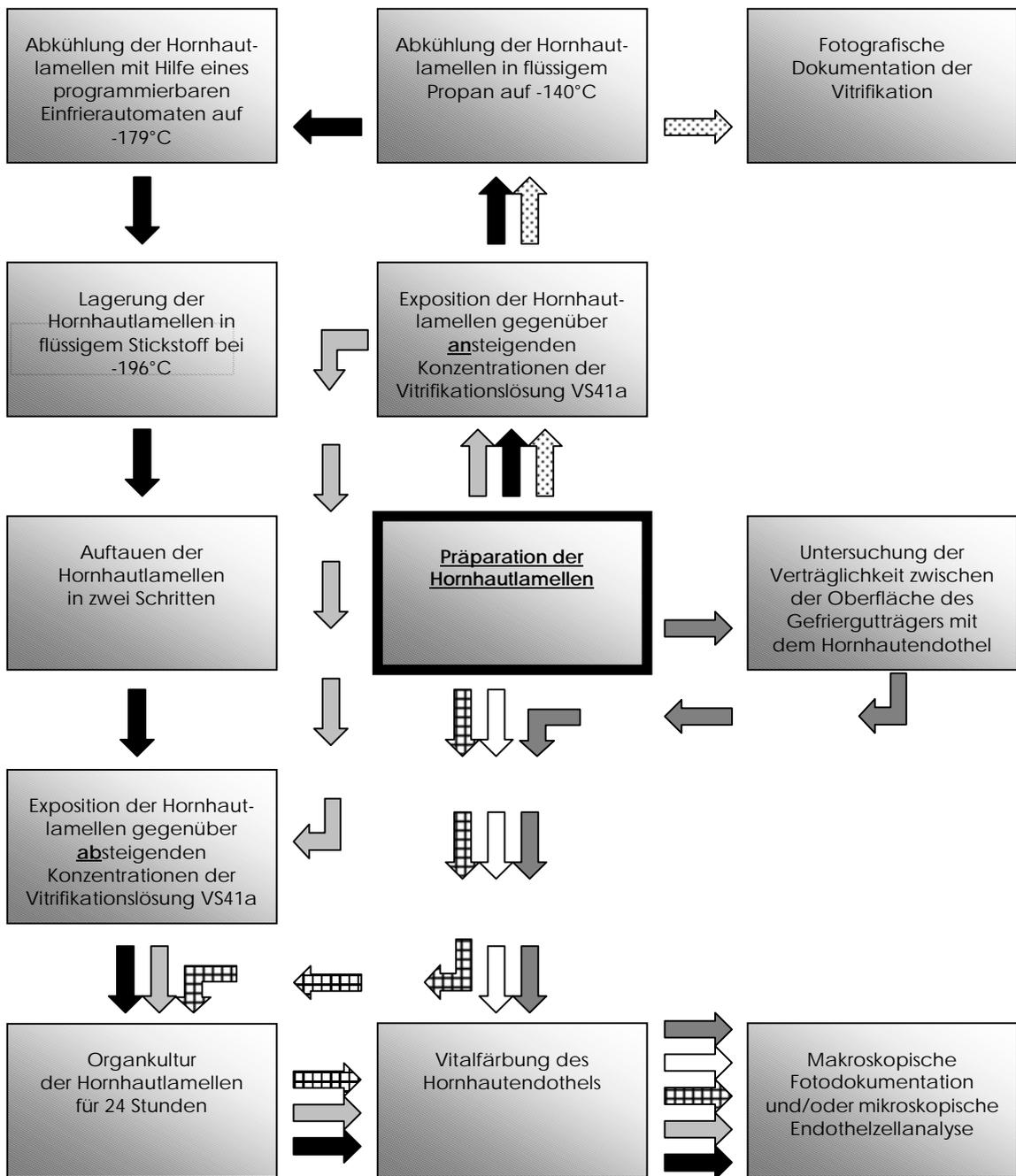
Bilder des Endothels wurden computerunterstützt analysiert. Die dazu notwendige Software wurde freundlicherweise von der Tomey Export GmbH zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um das Programm Tomey Confo Commander Version 2.6-Cell & Layer Analyser. Dieses Analyseprogramm ermöglicht die vollautomatische Analyse des Endothels mit Angaben über Zellzahl und -dichte, sowie über die Verteilung von Form und Größe der Endothelzellen (Abb. 10).



**Abbildung 10** Endothelzellanalyse mit Hilfe des TOMEY - CONFO-COMMANDER V. 2.6; Zelldichte: 4088 Zellen/mm<sup>2</sup>; analysiertes Gebiet:0,041 mm<sup>2</sup>; Zellanzahl: 169 Zellen; durchschnittliche Zellgröße: 244  $\mu$ m<sup>2</sup>.

## 2.13 Übersicht über den gesamten Verfahrensablauf

Die in den Kapiteln 2.1 bis 2.12 vorgestellten Materialien und Methoden wurden in unterschiedlichen Teilversuchen eingesetzt. Einen besseren Überblick über die im einzelnen durchgeführten Versuche soll die folgende Abbildung 11 verschaffen. Die Verläufe der grafisch unterschiedlich gestalteten Pfeile entsprechen den in Kapitel 3 näher erläuterten Versuchsabläufen.



**Abbildung 11** Übersicht über die im einzelnen untersuchten Arbeitsschritte des Verfahrens; □: Endothelzellanalyse unbehandelter Hornhautlamellen; ■: Verträglichkeit der Oberfläche des Gefriergutträgers mit dem Hornhautendothel; ▣: Vitrifikation von Hornhautlamellen bei -140°C; ■: Endothelzellanalyse nach Vitrifikation bei -196°C und Erwärmung im Wasserbad; ▣: Toleranz des Hornhautendothels gegenüber dem Organkulturmedium; □: Toleranz des Endothels gegenüber der Vitrifikationslösung