

## 4 Diskussion

### 4.1 Erzielte Fortschritte

Durch die Verwendung von hinteren Hornhautlamellen, durch den Einsatz eines neuen Gefriergutträgers und den Aufbau einer verbesserten Abkühlvorrichtung konnte im Zuge der durchgeführten Versuche erstmalig die Vitrifikation von Hornhautlamellen erreicht werden, ohne daß es zu einer makroskopisch sichtbaren Eis- oder Rißbildung im Gefriergut während des Abkühlvorganges kam. Dabei konnten Kryoprotektoren in einer Konzentration eingesetzt werden, die sich bei Untersuchungen von Bourne als nur geringgradig schädigend erwiesen hatten<sup>46</sup>(vgl. Tabelle 1.4).

1. Leitgedanke für die Entwicklung einer verbesserten Methode war es gewesen, die Masse des einzufrierenden Gewebes durch Verwendung von hinteren Hornhautlamellen weiter zu reduzieren. Die theoretischen Überlegungen, auf diese Weise sowohl ein schnelleres Eindringen der Kryoprotektoren in das Gewebe als auch ein schnelleres und besser kontrolliertes Einfrieren und Erwärmen der Hornhautlamelle zu erreichen, konnten im Experiment bestätigt werden. Obwohl Bourne die von ihm verwendeten Korneoskleralscheiben in gleicher Weise mit Kryoprotektoren behandelt hatte, gelang es ihm nicht, im dickeren Randbereich der Korneoskleralscheiben die Eisbildung zu verhindern. Durch Einsatz von Hornhautlamellen ist es nun möglich geworden, bei gleichbleibenden Expositionszeiten gegenüber den Kryoprotektoren eine ausreichend hohe Konzentration dieser Kryoprotektoren im Gewebe zu erreichen.
2. Die Verwendung von hinteren Hornhautlamellen wurde aber erst durch den Einsatz eines geeigneten Gefriergutbehälters ermöglicht. Der Gefriergutbehälter sollte dabei zum einen die sehr empfindliche Hornhautlamelle ausreichend vor mechanischen Belastungen schützen, zum anderen aber auch ein geringes Volumen aufweisen, um kurze Auftau- und Einfrierzeiten zu ermöglichen. Diese Anforderungen erfüllte der in diesen Vitrifikationsversuchen vorgestellte Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouch“. Der

wesentliche Vorteil dieses Gefriergutträgers liegt in seinen Oberflächeneigenschaften. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, daß ein Kontakt zwischen Endothel und der mit 0,1 ml Balanced Salt Solution bzw. VS41a befeuchteten „Peel-Pouch“-Wand nur zu minimalen Schäden führte. Bei herkömmlichen Gefriergutträgern aus Kupfer oder Aluminium konnte der schädigende Kontakt zur Wand des Gefriergutträgers nur durch Verwendung größerer Flüssigkeitsmengen, im günstigsten Fall 0,4 ml<sup>74</sup>, verhindert werden. Die Verwendung des Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouch“ als Gefriergutträger ermöglichte also eine erhebliche Reduktion der Menge an VS41a-Lösung während des Vitrifikations- und Auftauverfahrens. Der sich zwischen Lamelle und „Peel-Pouch“-Wand bildende Flüssigkeitsfilm sorgte zusammen mit der geringen Wandstärke (0,05 mm) des „Peel-Pouch“ für eine große, flächenhafte und gleichmäßige Wärmeübertragung zwischen Kühlmedium und Hornhautlamelle. Die Reduktion der Menge an Vitrifikationsmittel im „Peel-Pouch“ auf 0,1 ml verringerte zudem die Wärmekapazität des Gefriergutes und hatte damit positive Auswirkungen auf die Kühl- und Aufwärmraten. Ein weiterer Vorteil des aus Teflon und Kapton hergestellten „Peel-Pouch“ liegt darin, daß dieses Material nach den hier vorgestellten Untersuchungen keine Rißbildung in den vitrifizierten Medien verursacht. Hingegen wurde ein Auftreten von Rissen im Gefriergut bei Verwendung anderer Materialien beschrieben.<sup>46</sup> Die Transparenz des „Peel-Pouch“ erwies sich ebenfalls als vorteilhaft. Sie ermöglichte die Beobachtung, Kontrolle und den fotografischen Nachweis der ausbleibenden Eis- und Rißbildung.

3. Weitere Voraussetzung für die erzielten Ergebnisse war der Aufbau einer verbesserten Abkühlvorrichtung. Fahy hatte 1984 in einer Anleitung zu Vitrifikationsversuchen den Hinweis gegeben, das Gefriergut zu Beginn des Einfrierens nur bis zu einer Temperatur abzukühlen, die wenig unterhalb der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) liegt, da er andernfalls Rißbildungen im Gefriergut aufgrund des thermischen Stresses befürchtete.<sup>59</sup> Die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) der in dieser Arbeit verwendeten Vitrifikationslösung VS41a liegt nach Mehl bei  $-123^\circ\text{C}$ .<sup>71</sup> Ziel war es daher, das Gefriergut im ersten Schritt mit maximaler Kühlrate auf eine Temperatur von etwa  $-130^\circ\text{C}$  bis  $-145^\circ\text{C}$  abzukühlen. Die Verwendung programmierbarer Ein-

frierautomaten schied aus, da diese keine größeren Kühlraten als  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ermöglichen und damit die Bildung von Kristallisationskeimen während des Abkühlens begünstigt hätten. Auch das direkte Einbringen des Gefriergutes in flüssigen Stickstoff kam nicht in Betracht, weil dies eine Abkühlung auf  $-196^{\circ}\text{C}$  und damit eine Rißbildung zur Folge hatte. (vgl. Abb. 17) Stickstoff ist aber auch deshalb für das Abkühlen von Gefrierproben zum Zwecke der Vitrifikation ungeeignet, da es bei Kontakt mit dem Gefriergutträger aufgrund seines niedrigen Siedepunktes verdampft und die sich dabei bildende Dampfschicht den Wärmeübergang behindert (Leidenfrost-Phänomen). Diese bei Verwendung von flüssigem Stickstoff auftretenden Probleme konnten durch Verwendung von Propan vermieden werden. Der Siedepunkt von Propan liegt mit  $-42^{\circ}\text{C}$  um  $154^{\circ}\text{C}$  höher als der von Stickstoff. Dies bedingt einen höheren Wärmeübergang, da beim Kontakt des Gefriergutträgers mit Propan im Vergleich zum Stickstoff die Ausbildung einer Dampfschicht geringer ist. Um mit Hilfe des Propans das Gefriergut auf eine Temperatur von  $-130^{\circ}\text{C}$  bis  $-145^{\circ}\text{C}$  abzukühlen, mußte zunächst das Propan auf diese Temperatur herabgekühlt werden. Die Kühlung und die damit einhergehende Verflüssigung von Propan erfolgte durch Methylcyclopentan. Methylcyclopentan liegt bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vor. Durch seinen Schmelzpunkt von  $-142,4^{\circ}\text{C}$ <sup>75</sup> kann es durch Abkühlung mit flüssigem Stickstoff verfestigt werden. Nach Beendigung der Kühlung beginnt Methylcyclopentan zu schmelzen und besitzt dann die angestrebte Temperatur von etwa  $-140^{\circ}\text{C}$ . Durch die Kühlung von Methylcyclopentan in flüssigem Stickstoff, der anschließenden Kühlung von Propan in dem geschmolzenem Methylcyclopentan und schließlich durch die Kühlung des Gefriergutes in Propan wurde also das erstrebte Ziel erreicht, das Gefriergut im ersten Schritt schockartig auf eine Temperatur von etwa  $-140^{\circ}\text{C}$  abzukühlen.

Diese Überlegungen und Versuchsanordnungen führten dann, wie in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt, erstmalig zu einer erfolgreichen Vitrifikation von Hornhautlamellen.

## 4.2 Vorteile und Perspektiven der Vitrifikation

Wie eingangs dargestellt stehen für die experimentelle Gefrierkonservierung von Hornhäuten zwei vom Prinzip her unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Die Mehrzahl der Untersucher verfolgte dabei den Ansatz des herkömmlichen Einfrierens. Obwohl bereits seit den fünfziger Jahren versucht wird auf diesem Weg die Gefrierkonservierung von Hornhäuten zu erreichen, ist bislang kein routinemäßig einsetzbares Verfahren entwickelt worden. Ursache dafür ist die Vielzahl an Parametern (vgl. S. 22), die bei diesem Verfahren Einfluß auf die Vitalität des Gewebes haben. Einer der wichtigsten Parameter für das Verfahren des herkömmlichen Einfrierens ist die Kühlrate. Diese muß der jeweils einzufrierenden Zellart optimal angepaßt sein. Es ist der entscheidende Vorteil der Vitrifikation, dem zweiten für die Gefrierkonservierung zur Verfügung stehenden Verfahren, daß sie keine für die jeweilige Zellart optimale Kühlrate erfordert. Da Organe aus verschiedenen Zellarten bestehen, ist für deren Gefrierkonservierung die Vitrifikation das geeignetere Verfahren. Dieser Vorteil der Vitrifikation wird jedoch durch die sehr hohen Konzentrationen an Kryoprotektoren, die dieses Verfahren benötigt, geschmälert. Die seit Mitte der achtziger Jahre unternommenen Versuche zur Vitrifikation von Hornhäuten beschäftigten sich daher vorwiegend mit der Suche nach einer in hoher Konzentration einsetzbaren Vitrifikationslösung, die keine oder geringe zelltoxische Eigenschaften besitzt. Es wurde auch ausführlich untersucht, auf welche Weise Hornhäute diesen Vitrifikationslösungen ausgesetzt werden können, ohne osmotisch bedingte Zellschäden zu provozieren. Da die Lösung dieses Problems nach wie vor aussteht, haben einige Untersucher die Vitrifikation als geeignetes Verfahren zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten in Frage gestellt. Die Tatsache, daß ein Teil der Endothelzellen die Vitrifikation sowohl in der hier vorgestellten Arbeit, als auch bei den Untersuchungen Bournes überlebt haben, zeigt aber, daß ein insgesamt erfolgreiches Vitrifikationsverfahren für Hornhautlamellen prinzipiell möglich ist. Durch das große Interesse an dem zentralen Problem der Toxizität der Vitrifikationslösungen sind andere Ansatzpunkte für eine mögliche Verbesserung des Vitrifikationsverfahrens in den Hintergrund getreten. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß beispielsweise durch Veränderungen des Gefriergutbehälters und der Abkühlvorrichtung eine Vitrifikation

von Hornhautlamellen möglich geworden ist. Da höhere Kühlraten durch verbesserte Abkühlvorrichtungen und die Reduktion des zu vitrifizierenden Hornhautgewebes auch eine Verringerung der für die Vitrifikation benötigten Konzentrationen an Vitrifikationslösungen in Aussicht stellen, sind auf diesem Weg möglicherweise die durch die Toxizität der Vitrifikationslösungen bestehenden Probleme zu umgehen.

### 4.3 Toxizität der Kryoprotektoren

Zur Entwicklung von VS41a war es gekommen, nachdem Fahy 1991 eine Vitrifikationslösung namens VS4 vorstellte, die er für Vitrifikationsversuche an Kaninchen-Nieren zusammengestellt hatte. Sie enthielt 2,76 mol/l Dimethylsulfoxid, 1,97 mol/l 1,2-Propandiol und 2,75 mol/l Formamid.<sup>76</sup> Die Konzentration an Kryoprotektoren war jedoch in Kombination mit den aufgrund der Organgröße geringen Kühlraten nicht hoch genug, um eine Kristallisation zu verhindern. Eine Vitrifikation wäre nur unter erhöhten Druckverhältnissen in einem Druckbehälter oder durch eine Anhebung der Konzentration an Kryoprotektoren möglich gewesen. Daher stellte Fahy ein neues Gefrierschutzmedium namens VS41a her, das aufgrund seiner höheren Konzentration an Gefrierschutzmitteln unter einem Druck von 1 atm die gleichen vitrifizierenden Eigenschaften besitzt, wie VS4 unter 1000 atm. Als Basismedium diente Euro-Collins.

Bourne modifizierte 1994 VS41a für seine Vitrifikationsversuche mit menschlichen Hornhäuten, indem er das Basismedium Euro-Collins gegen CPTES (corneal-potassium-TES) austauschte. CPTES ist ein von Taylor 1985 entwickeltes Basismedium zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten. Seine Überlegung war, daß es bei Konservierungsmethoden unter Verwendung niedriger Temperaturen weniger sinnvoll sei, den Stoffwechsel der Zellen zu unterstützen, es vielmehr versucht werden müsse, die Zellen vor Änderungen des Wasser- und Elektrolytgehalts zu schützen. Diesen Veränderungen sind die Zellen bei niedrigen Temperaturen vermehrt ausgesetzt, weil die Ionenpumpen der Endothelzellen unter diesen Bedingungen nur eingeschränkt tätig sind. CPTES soll daher ein intrazelluläres Milieu im „Extrazellularraum“ nachahmen. Um eine Präzipitation von Kalzium bei Zugabe von Dimethylsulfoxid zu verhindern, empfiehlt Taylor

CPTES ohne Zusatz von Kalziumchlorid zu verwenden.<sup>39</sup> Bourne modifizierte ebenfalls die CPTES-Lösung, indem er 2,5% Chondroitinsulfat beifügte.<sup>46</sup>

Nach Untersuchungen von Lindstrom besitzen die verschiedenen Typen des Chondroitinsulfates unterschiedliche Biokompatibilität gegenüber den Endothelzellen. Die beste Verträglichkeit zeigten danach Chondroitinsulfat A und eine zu 99% gereinigte Mischung aus Chondroitinsulfat A und C.<sup>10</sup>

Obwohl VS41a speziell für die Gefrierkonservierung von Hornhäuten entwickelt worden ist, muß die toxische Wirkung dieser Vitrifikationslösung als Ursache für die geringe Endothelvitalität nach Durchführung des gesamten Vitrifikationsverfahrens angesehen werden. Diese Aussage stützt sich auf die in dieser Arbeit in drei verschiedenen Modifikationen durchgeführten Toxizitätsuntersuchungen mit VS41a.

1. Die Bournes Vorschlag entsprechende Toxizitätsuntersuchung an sechs Hornhautlamellen ergab eine deutliche und zudem stark variierende Endothelzellschädigung von 2% bis 70% (vgl. Tab. 3.7). Dieses Ergebnis ist nicht zu erwarten gewesen, da Bourne in seinen Untersuchungen an sieben menschlichen Hornhäuten nach dem gleichen Protokoll (vgl. Tab. 2.2 und 2.7) ebenfalls die toxischen Wirkungen von VS41a auf das Endothel untersucht hatte und einen durchschnittlichen Endothelzellverlust von nur 4,3% ermittelt hatte.<sup>46</sup> Ein Erklärungsansatz liegt möglicherweise in einem empfindlicheren Verhalten der hier untersuchten Schweinehornhäute im Vergleich zu den von Bourne untersuchten menschlichen Hornhäuten. Das unterschiedliche Ergebnis der Endothelschädigung kann hingegen nicht auf die Verwendung von Hornhautlamellen zurückgeführt werden, denn das Endothel kommt aufgrund seiner oberflächlichen Lage sowohl bei Verwendung von Korneoskleralscheiben, als auch bei Einsatz von Hornhautlamellen direkt mit den toxischen Kryoprotektoren in Kontakt. Die Differenz zwischen dem hier vorgestellten Ergebnis und dem von Bourne erzielten Ergebnis könnte in der erwähnten Variabilität der einzelnen Endothelbefunde begründet sein. In weiteren Untersuchungen sollten die Faktoren ermittelt werden, die zu diesen unterschiedlichen Reaktionen des Endothels führen. Vor allem sollten die Ursachen für die flächenhafte Endothelablösung geklärt werden, da diese den eigentlichen Zellverlust bedingt.

2. Das zweite Verfahren bei dem die Toxizität von Kryoprotektoren dadurch vermindert werden sollte, daß die Expositionszeit gegenüber den mittleren Konzentrationsstufen verkürzt wurde, ohne die Expositionszeit gegenüber der Höchstkonzentration zu reduzieren, erbrachte ein schlechteres Ergebnis, als bei Anwendung des von Bourne entwickelten Protokolls. Auch in dieser Versuchsgruppe zeigte sich eine stark variierende Schädigung des Endothels von 9-71% der Lamellenoberfläche (vgl. Tab. 3.9).
3. Das dritte Verfahren einer Exposition der Hornhautlamellen gegenüber VS41a beruhte auf Ergebnissen von Wusteman (vgl. Tab. 2.4 und 2.8). Danach sollte die Toleranz des Endothels gegenüber Dimethylsulfoxid dadurch verbessert werden, daß die Hornhäute nicht bei 0°C, sondern bei Raumtemperatur dem Gefrierschutzmittel ausgesetzt werden. Grundlage für diese Hypothese war, daß höhere Temperaturen zu einem schnelleren Eindringen der Kryoprotektoren in das Gewebe führen und somit eine Verkürzung der Expositionsdauer ermöglichen.<sup>47</sup> Die Anwendung dieses Prinzips in der hier vorgestellten Untersuchung bedingte das schlechteste Ergebnis (vgl. Tab. 3.10).

Folglich konnte in keinem der untersuchten Verfahren eine Toleranz des Endothels gegenüber VS41a erzielt werden. Die Toxizität der Kryoprotektoren bleibt daher ein zentrales Problem bei der Etablierung eines erfolgreichen Vitrifikationsverfahrens für Hornhäute.

#### 4.4 Devitrifikation

Ein weiteres zentrales Problem stellt die Devitrifikation beim Erwärmen des Gefriergutes dar. Sie wird, wie auch die Vitrifikation, nicht nur durch die Kryoprotektoren beeinflusst. Sie kann theoretisch verhindert werden, indem das Gewebe mit einer Heizrate erwärmt wird, die oberhalb der kritischen Aufwärmrate liegt. Die kritische Aufwärmrate, ist die Rate, oberhalb derer es zu keinem Wachstum von Kristallisationskeimen kommt, die sich während des Abkühlens gebildet haben. Die kritische Aufwärmrate ist abhängig von der Konzentration der verwendeten Kryoprotektoren. Nach Untersuchungen von Mehl beträgt die kritische Aufwärmrate für reines VS41a bei einer Mediummenge von 20µl 50°C/min, wenn VS41a zuvor mit einer

Kühlrate von  $2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  abgekühlt worden ist.<sup>71</sup> In dem für die Vitrifikation entscheidenden Temperaturbereich zwischen  $0^{\circ}\text{C}$  und  $-140^{\circ}\text{C}$  lagen die Kühlrate ( $\gg 200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) und die Aufwärmrate ( $\sim 3060^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) bei dem hier vorgestellten Verfahren beide deutlich über den von Mehl angegebenen Werten. Dennoch konnte die Devitrifikation der in einer Mediummenge von  $100\mu\text{l}$  eingebetteten Hornhautlamelle nicht sicher verhindert werden. Bei drei Lamellen wurde zwar keine Devitrifikation beobachtet, doch zeigte sich bei weiteren drei Lamellen eine Eisbildung. Dieses Eis war allerdings zwei Sekunden nach Beginn des Erwärmens bereits wieder geschmolzen. Die erreichte extrem kurze Auftauzeit läßt erkennen, daß die kritische Aufwärmrate durch Nutzung eines  $40^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbades fast erreicht wurde.

Alternative Verfahren zur Erwärmung des Gefriergutes bringen gravierende Nachteile mit sich. So führt Ultraschall zu erheblichen mechanischen Belastungen, während bei Mikrowellen wegen der selektiven Wärmeerzeugung in der Flüssigkeit die Gefahr der punktuellen Überhitzung droht.<sup>35</sup> Die Erwärmung durch Wärmeströmung (Konvektion), also durch Kontakt mit einer warmen strömenden Flüssigkeit, ist hingegen einfach und sicher. Sie ist daher die bei bisherigen Versuchen zur Gefrierkonservierung von Hornhäuten bevorzugt verwendete Methode. Sie bietet Schutz vor Überwärmung und damit vor einer Denaturierung des Gewebes, weil kein Bereich der Hornhaut wärmer als die Flüssigkeit wird. Möglicherweise kommt es aber durch die im bewegten Wasserbad entstehende und für einen schnelleren Wärmeaustausch erwünschte Strömung zur Einwirkung von Scherkräften auf das Hornhautendothel. Diese auftretenden Scherkräfte könnten mitverantwortlich sein für die in diesen Versuchen beobachtete flächenhafte Endothelablösung. Ein weiterer Nachteil der Erwärmung durch Wärmeströmung ist der unvermeidbare asymptotische Zeitverlauf der Gewebetemperatur sowie die mit zunehmender Heizrate immer größeren örtlichen Inhomogenitäten von Heizraten und Tauzeiten aufgrund der Wärmeeinleitung durch die Oberfläche. Durch die Reduzierung des Gefriergutvolumens läßt sich jedoch mit dieser Methode fast jede von der Homogenität her vertretbare Heizrate erreichen.<sup>35</sup> Die Erwärmung in einem bewegten  $40^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad ist daher anderen Möglichkeiten vorzuziehen.

## 4.5 Berücksichtigung der post-mortem-Zeit

Neben der Vermeidung einer Schädigung des Hornhautgewebes durch das Vitrifikationsverfahren ist die Qualität des Gewebes vor Beginn der Vitrifikation für eine erfolgreiche Gefrierkonservierung von Bedeutung.

Die Qualität des Gewebes ist von der post-mortem-Zeit abhängig. Unter der post-mortem-Zeit versteht man die Zeit zwischen dem Tod des Organspenders und dem Beginn der Gefrierkonservierung der Hornhaut. Sie bestimmt das Maß der nach dem Tod durch die unterbrochene Zufuhr an Nährstoffen und Sauerstoff einsetzende Autolyse der okulären Strukturen. Böhnke hat 1991 den Einfluß der post-mortem-Zeit auf die Endothelzellvitalität nach Kryokonservierung untersucht. Er stellte fest, daß eine post-mortem-Zeit bis zu 32 Stunden keinen nennenswerten Einfluß auf das Überleben von Endothelzellen hat, sofern die Hornhäute in dieser Zeit in der feuchten Kammer bei 4°C gelagert werden.<sup>77</sup> Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde eine post-mortem-Zeit von 32 Stunden bis zur Kryokonservierung stets deutlich unterschritten, so daß die von einigen Autoren zur Regeneration des Hornhautendothels vorgeschlagene Organkultur vor Beginn der Gefrierkonservierung nicht erforderlich war.<sup>72</sup>

## 4.6 Aussagekraft der Endothelzellanalyse

Die am Ende aller Versuche durchgeführte Endothelzellanalyse beruhte auf makroskopischen und lichtmikroskopischen Fotografien des Hornhautendothels, nachdem dieses mit den Vitalfarbstoffen Trypanblau und Alizarinrot S angefärbt worden war. Einer der wichtigsten Nachteile dieser Methode ist es, daß auch Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, deren Membranpermeabilität zwar verändert ist, die aber nicht terminal geschädigt sind. Ferner gibt eine ausschließlich morphologische Untersuchung nur indirekt Aufschluß über die erhaltene bzw. gestörte Funktion des Endothels. Dennoch gehört die Vitalfärbung mit Trypanblau und Alizarinrot S zu den Untersuchungsverfahren mit einer hohen Aussagekraft.<sup>73</sup> Neben der Vitalfärbung existieren zahlreiche andere Verfahren, um die Vitalität des Endothels zu untersuchen. Dazu gehören die Elektronenmikroskopie, die Gewebekultur, der histochemische Enzymnachweis, die Dickenmessung der Hornhaut, elektrophysiologische Messungen und die

Hornhauttransplantation.<sup>1</sup> Der Erfolg einer jeden Konservierungsmethode sollte vor dem klinischen Einsatz am Tiermodell bestätigt werden.

Die Güte der Endothelzellanalyse wird auch von der Wahl eines geeigneten Befundungszeitpunktes bestimmt. Eine sichere morphologische Befundung des Endothels kann nicht unmittelbar nach dem Auftauen durchgeführt werden, weil latente Schädigungen des Endothels sich nicht unmittelbar nach dem Auftauen zeigen. Es ist daher vor der morphologischen Befundung die Kultivierung der Hornhaut notwendig.<sup>78</sup> Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist nach 24-stündiger Aufbewahrung der Lamellen im Brutschrank noch kein Zellverlust durch die Organkultur eingetreten. Wie auch von anderen Untersuchern gezeigt werden konnte, scheint dieser Zeitpunkt daher geeignet zu sein, die morphologische Befundung durchzuführen.<sup>78 79</sup>

Die Eignung der in dieser Arbeit zur Auswertung eingesetzten Analyse-Software der Tomey Export GmbH konnte im Rahmen der Analyse unbehandelter Hornhautlamellen nachgewiesen werden. Die mittlere Standardabweichung der Zelldichten (55,7) betrug bei der Analyse unbehandelter Hornhautlamellen etwa 1,4% der mittleren Zelldichte (4063 Zellen/mm<sup>2</sup>). Gleiches galt für die Betrachtung der Zellgrößen. Diese geringe Abweichung von 1,4% rechtfertigt die Angabe von Mittelwerten der Zelldichten und Zellgrößen.(vgl. Tab. 3.2) Die stark schwankenden interindividuellen Ausgangszelldichten des Hornhautendothels ermöglichten nur eine deskriptive Befundung und verhinderten eine weitere statistische Auswertung. Um das Ausmaß der Endothelschädigung durch die Vitrifikationslösungen präziser ermitteln zu können wäre für zukünftige Untersuchungen die Bestimmung der Ausgangszelldichten jeder einzelnen Hornhaut vor Beginn des Vitrifikationsverfahrens wünschenswert.

#### 4.7 Vorschläge für Untersuchungen zur weiteren Verbesserung des Vitrifikationsverfahrens

Die in dieser Arbeit beschriebene Unverträglichkeit zwischen der Vitrifikationslösung VS41a und dem Endothel sowie die beim Erwärmen auftretende Devitrifikation machen weitere Verbesserungen des Vitrifikationsverfahrens notwendig.

Dem Problem der Toxizität von VS41a könnte durch einen Austausch der darin enthaltenen Kryoprotektoren begegnet werden. Als Modifikation bietet sich ein Austausch von 1,2-Propandiol durch 2,3-Butandiol an. Boutron fand heraus, daß 2,3-Butandiol trotz 5% geringerer Konzentration die gleichen vitrifizierenden Eigenschaften besitzt wie 1,2-Propandiol.<sup>80</sup> Die besseren glasbildenden (vitrifizierenden) Eigenschaften von 2,3-Butandiol erlauben vermutlich dessen Einsatz in geringeren Konzentrationen. Möglicherweise führt dies bereits zu einer ausreichenden Herabsetzung der Toxizität der Vitrifikationslösung. Nach den Angaben von Boutron sollte dabei berücksichtigt werden, das (+)-2,3-Butandiol und (-)-2,3-Butandiol weniger zelltoxisch wirken als meso-2,3-Butandiol. Ein Nachteil der isolierten (+)- und (-)-Isomere ist ihr sehr hoher Preis.

Seit Dezember 1999 ist ein weiteres, bislang nicht für die Vitrifikation von Hornhäuten eingesetztes kryoprotektives Additiv erhältlich. Es handelt sich dabei um den von der Firma 21<sup>st</sup> Century Medicine hergestellten „Ice-Blocker Supercool X-1000“. Dieser speziell als Zusatz für Vitrifikationslösungen entwickelte Polyvinylalkohol bindet und inaktiviert die in der Vitrifikationslösung enthaltenen Verunreinigungen und verhindert so die von ihnen ausgehende Kristallbildung. Dieser Wirkmechanismus soll auch helfen, die Devitrifikation bereits bei geringeren Aufwärmraten zu verhindern.<sup>81</sup> In weiteren Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, ob der „Ice-Blocker Supercool X-1000“ endothelschädigende Eigenschaften besitzt.

Neben einer Modifikation der Vitrifikationslösung bieten sich auch noch Verbesserungen im Verfahrensablauf an. In der hier vorgestellten Untersuchung erfolgte die Erwärmung des Gefriergutes im Wasserbad bei einer Ausgangstemperatur des Gefriergutes von  $-140^{\circ}\text{C}$ . Da nach Angaben von Mehl bei Verwendung von VS41a jedoch erst ab einer Temperatur oberhalb von  $-85^{\circ}\text{C}$  mit einem Kristallwachstum zu rechnen ist<sup>71</sup>, könnte in weiteren Untersuchungen der Schritt der langsamen Erwärmung mit  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis zu einer Temperatur von etwa  $-90^{\circ}\text{C}$  erfolgen. Die Erwärmung im Wasserbad würde dann statt bei einer Ausgangstemperatur des Gefriergutes von  $-140^{\circ}\text{C}$  bereits bei  $-90^{\circ}\text{C}$  beginnen. Auf diese Weise könnte eine schnellere Erwärmung der Hornhaut erzielt werden und die Devitrifikation verhindert werden.

Erfolgversprechend ist auch die Erprobung einer neuen Tieftemperatur-Experimentiereinrichtung, die gegenüber der in dieser Arbeit vorgestellten Einfriervorrichtung zwei weitere Eigenschaften besitzen sollte.

- Zum einen sollte sie die Abkühlung des Gefriergutes unter erhöhtem Druck ermöglichen, weil eine Druckerhöhung für die Anhebung der Glasübergangstemperatur und für eine erst bei tieferen Temperaturen einsetzende Kristallbildung sorgt. Dies würde eine Absenkung der für die Vitrifikation notwendigen Konzentrationen an Kryoprotektoren und eine damit einhergehende Reduktion ihrer zelltoxischen Eigenschaften bedingen.
- Zum anderen ist die Verwendung von Helium als Kühlmittel zu erproben. Es ist denkbar, daß unter Einsatz von Helium aufgrund seiner hervorragenden wärmeübertragenden Eigenschaften höhere Abkühlraten erreichbar sind. Da Helium jedoch einen Siedepunkt von  $-268,9^{\circ}\text{C}$  besitzt, liegt es bei der für die Vitrifikation angestrebten Temperatur von  $-140^{\circ}\text{C}$  als Gas vor. Daher ist die Verwendung von Helium als Kühlmittel nur in Kombination mit einer Erhöhung des hydrostatischen Drucks vorstellbar, die eine Verflüssigung des Heliums bereits bei  $-140^{\circ}\text{C}$  bedingt.

Die in dieser Arbeit erzielte Vitrifikation hinterer Hornhautlamellen läßt erwarten, daß weitere Modifikationen des Verfahrens zu einer insgesamt erfolgreichen Gefrierkonservierung von Hornhäuten führen werden.