

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Gefrierschutzlösungen auf die Ultrastruktur des Endothels konservierter Hornhäute

W.K. Waller und F.X. Gentner

Universitäts-Augenklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Leydhecker), Josef-Schneider-Str. 11, D-8700 Würzburg, Bundesrepublik Deutschland

The Influence of Cryoprotective Solutions on the Ultrastructure of Rabbit Corneal Endothelium

Summary. A series of rabbit corneae was preserved at -196°C in liquid nitrogen using five different cryoprotective solutions: (1) 5% dextran T 40, (2) 10% polyvinylpyrrolidone, (3) 5% dextran T 40 + 10% polyvinylpyrrolidone + dimethyl sulfoxide, (4) 25% rabbit albumin + 10% polyvinylpyrrolidone, (5) 25% rabbit albumin + dimethyl sulfoxide.

After thawing the corneae, the influence of the different cryoprotective solutions on the ultrastructure of corneal endothelium was evaluated and compared with fresh corneae. The results were as follows:

(1) Using 5% dextran T40 or 10% polyvinylpyrrolidone or 25% rabbit albumin as cryoprotective solutions marked intracellular damage.

(2) Adding dimethyl sulfoxide to the solutions cryopreservation appeared to be more successful at the cellular basis, despite the freezing and thawing procedure mediated moderate intracellular changes.

Cryopreservation including dimethyl sulfoxide renders better conditions for successful corneal grafting in the light of ultrastructural aspects.

Zusammenfassung. Kaninchenhornhäute wurden mit fünf verschiedenen Gefrierschutzlösungen bei -196°C in flüssigem Stickstoff konserviert: 1. 5% Dextran T40, 2. 10% Polyvinylpyrrolidon, 3. 5% Dextran T40 + 10% Polyvinylpyrrolidon + Dimethylsulfoxid, 4. 25% Kaninchenserumalbumin + 10% Polyvinylpyrrolidon, 5. 25% Kaninchenserumalbumin + Dimethylsulfoxid.

Nach Auftauen der Präparate wurde der Einfluß der verschiedenen Gefrierschutzlösungen auf die Feinstruktur des Hornhautendothels elektronenmikroskopisch untersucht und mit frisch fixierten Hornhäuten verglichen.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

1. Bei der Verwendung von 5% Dextran T40, 10% Polyvinylpyrrolidon oder 25% Kaninchenserumalbumin + 10% Polyvinylpyrrolidon als Gefrier-

* Mit Unterstützung der Stiftung Volkswagenwerk (AZ:111516)

schutzlösung traten massive Zellzerstörungen und Veränderungen an den Organellen auf.

2. Beim Zusatz von Dimethylsulfoxid zu den Gefrierschutzlösungen werden die Zellen als Ganzes gut konserviert, es entstehen jedoch durch den Einfrier- und Auftauvorgang an den Zellorganellen Veränderungen.

Bei Konservierung mit Dimethylsulfoxid bieten die Hornhäute nach strukturellen Gesichtspunkten gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Keratoplastik.

Die Konservierung von Hornhäuten bei tiefen Temperaturen und ihre Verwendung nach dem Auftauen zu perforierenden Keratoplastiken stellt ein wichtiges Verfahren dar, das gegenüber der Übertragung frischer Hornhäute zahlreiche Vorteile bietet (Waller, 1973): Die Transplantationen können unter personell und zeitlich optimalen Bedingungen vorgenommen werden. Nicht benötigte Hornhäute können für geeignete Empfänger aufgehoben werden, und im Notfall können auch Spenderhornhäute in speziellen Gefrierbehältern an jeden beliebigen Ort transportiert werden.

Die wachsende Zahl an Konservierungsmethoden erforderte in den letzten Jahre objektive Maßstäbe zur Beurteilung ihrer Wirksamkeit. Außerdem waren Auswahlkriterien notwendig, um die klinische Verwendbarkeit von angebotenen Spenderhornhäuten für eine Verpflanzung festzulegen.

Sehr viele Methoden, die zu diesem Zweck entwickelt wurden, beruhen auf der Untersuchung der strukturellen und metabolischen Veränderungen des am Konservierungsprozeß beteiligten oder zu einer Transplantation zur Verfügung gestellten Zellmaterials. Da die Überlebensfähigkeit von Zellen an das Vorhandensein bestimmter struktureller und metabolischer Voraussetzungen gebunden ist, lassen sich durch Untersuchungen dieser Vitalfunktionen Aussagen über die Überlebensrate der Zellen machen.

Gefrierschutzlösungen vermindern die bei der Gefrierkonservierung induzierten Zellschäden. Hinsichtlich des Schutzeffektes besteht jedoch ein qualitativer Unterschied, der sowohl von der Lösung selbst als auch von der Art des Gewebes abhängt (Leibo u. Mazur, 1971). Strukturelle Integrität und Veränderungen an den Zellen lassen Rückschlüsse auf die Vitalfunktion der Gewebe zu.

In dieser Arbeit wird der Einfluß verschiedener Gefrierschutzlösungen auf die Ultrastruktur konservierter Hornhäute untersucht.

Entsprechend der Bedeutung des Endothels für die Transparenz der Hornhaut (Mishima u. Kudo, 1967; Trenberth u. Mishima, 1968) und für den Erfolg einer Hornhautüberpflanzung werden die ultrastrukturellen Veränderungen nur dieser Zellschicht mitgeteilt.

Material and Methode

Die Untersuchungen wurden mit Augen von männlichen 2–3 kg schweren New Zealand-Kaninchen ausgeführt. Dabei wurde das von Capella et al. (1965) entwickelte Konservierungsverfahren modifiziert.

1. Vorbereitung der Lösungen

In Abänderung der von obengenannten Autoren beschriebenen Methode wurde bei diesen Versuchen mit fünf verschiedenen Gefrierschutzlösungen gearbeitet. Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung und Osmolarität der verschiedenen Medien.

Die einzelnen Lösungen wurden aus Trockensubstanz und Aqua bidestillata angesetzt und im Kühlschrank gelagert. Ausgenommen davon war Dimethylsulfoxid, das als 99,77%ige Lösung verwendet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde. Der p_{H} der Medien wurde mit Natronlauge, bzw. Salzsäure auf physiologische Werte von 7,2–7,4 eingestellt. Vor Versuchsbeginn wurden jeweils 2 ml der einzelnen Lösungsgemische in spezielle Glaszylindergefäße pipettiert und im Kühlgerät bei einer Wassertemperatur von + 4° C bereitgehalten.

Tabelle 1. Zusammensetzung und Osmolarität der Gefrierschutzlösungen

Lösung Nr.	Zusammensetzung	ml	mOsm
1	5% Dextran T 40 ^a	2,0	10
2	10% PVP ^b	2,0	25
3 ^c	5% Dextran T 40	1,2	1800
	10% PVP	0,6	
	DMSO ^c	0,2	
4	25% KSA ^d	1,0	300
	10% PVP	1,0	
5 ^e	25% KSA	1,8	2600
	DMSO	0,2	

^a Dextran T 40 (Merck)

^b Polyvinylpyrrolidon (Serva)

^c Dimethylsulfoxid (Merck)

^d Kaninchenserumalbumin (Albumin, Rabbit, Fraction V powder, Sigma)

^e DMSO darf nur in kleinen Einzelmengen und unter Mischen dem auf + 4° C gekühlten KSA beigemischt werden, da bei der Zugabe der Gesamtmenge in einer Portion das KSA denaturiert wird

2. Präparation der Hornhaut

Nach zervikaler Dislokation wurden die Kaninchen aus der Arteria carotis entblutet. Anschließend wurden die Augen enucleiert und bis zur Präparation in eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gelegt. Bei der Präparation wurden die Hornhäute mit Rasierklinge und feiner Schere mit einem 2 mm breiten Sklerarand vom Bulbus abgetrennt. Zur besseren Handhabung wurde am Sklerarand ein 5 cm langer feiner Haltefaden verknötet.

Bei der Präparation wurde ein Abfließen des Kammerwassers aus der Vorderkammer vermieden, um eine Berührung von Iris und Hornhautendothel zu verhindern.

Die so gewonnenen Präparate wurden dann vorsichtig in die vorbereiteten Gefrierschutzlösungen eingebracht und in den Glasbehältern bei + 4° C zwischen 15 und 35 min inkubiert.

3. Gefrierkonservierung

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Hornhäute mit den Glasgefäßen in größere zylindrische Kunststoffbehälter mit Schraubverschlüssen übergeführt und im vorbereiteten "controlled rate freezer" mit flüssigem Stickstoff bis - 79° C gefroren.

Zwischen $+4^{\circ}\text{C}$ und -14°C betrug die Gefriertrate $2-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, nach dem eutektischen Punkt wurde die Gefriertrate auf $5-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erhöht. Nach dem Kühlen bis -79°C wurden die Gefäße mit den Hornhäuten bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei dieser Temperatur wurden die Präparate zwischen 7 und 40 Tagen aufbewahrt.

4. Auftauprozess

Die tiefgefrorenen Hornhäute wurden mit den Glasgefäßen 80 sec in ein Wasserbad von $+60^{\circ}\text{C}$ getaucht. Man verhütet eine Überhitzung der Präparate, wenn man die Behälter aus dem Wasserbad nimmt, bevor die Hornhäute völlig aufgetaut sind. Als Zeichen dafür dient ein kleiner Eisball im Zentrum der Hornhaut. Das dann bei Zimmertemperatur protrahierte Auftauen dieses gefrorenen Bereiches ist Indikator für einen nicht überschrittenen physiologischen Temperaturbereich in der Hornhaut. Eine Schädigung der Cornea durch den sogenannten "thermal runaway" (Capella, 1973) ist dadurch nicht möglich. Abschließend wurden die Hornhäute aus den Gefrierschutzlösungen genommen und bei $+4^{\circ}\text{C}$ in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Damit wird den durch den Gefriervorgang dehydrierten Präparaten Möglichkeit zur Rehydrierung gegeben. Außerdem werden dadurch Reste der Gefrierschutzlösungen aus dem Gewebe entfernt.

5. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Alle Hornhäute wurden in 2,5%igem Glutaraldehyd (gelöst in 0,1 mol Phosphatpuffer; pH 7,4; 480 mOsmol) für 8 h fixiert und 2×10 min in 0,1 mol Phosphatpuffer + 0,2 mol Saccharose (420 mOsmol) gespült und über Nacht in einer dritten Portion aufbewahrt. Nachfixiert wurde 2 h mit 2%iger Osmiumsäure nach Caulfield (1957) bei $+4^{\circ}\text{C}$ und 1 h in 0,5%igem Uranylacetat, gelöst in Veronalacetatpuffer, pH 5,0, im Dunkeln und bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden die Hornhäute in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Epon 812 (Luft, 1961) eingebettet. Die Präparateblöckchen wurden an der Trimmeinrichtung TM 60 von Reichert getrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit dem Diamantmesser von DuPont am Ultramikrotom Om U3 von Reichert geschnitten. Die Schnitte wurden auf Kupfernetze aufgezogen und mit Uranylacetat (Walton, 1958) und Bleicitrat (Reynolds, 1963) doppeltkontrastiert. Untersucht wurden die Präparate am EM 9-S von Zeiss.

Ergebnisse

1. Konservierung in 5% Dextran T40 (Abb. 1 und 2)

Die meisten Endothelzellen der mit 5%igem Dextran T40 konservierten Hornhäute zeigen starke Schäden. Viele von ihnen sind durch Zellerreißung untergegangen.

Von den wenigen noch erhaltenen Zellen sind die Oberflächen sehr unregelmäßig. Die Zellmembranen sind oft zu riesigen Vakuolen erweitert.

Die Mitochondrien sind bei zahlreichen Zellen gequollen und zeigen den Verlust großer Teile der Matrix. Bei den noch besser erhaltenen Endothelien dieser Gruppe zeigen die Mitochondrien ebenfalls eine mäßige Schwellung, ihre Matrix ist aber intakt, und die Cristae zeigen eine vergleichbar normale Konfiguration (Abb. 1).

Das endoplasmatische Reticulum der schwer alterierten Zellen kann in vielen Fällen nicht von den übrigen zerstörten Zellorganellen unterschieden werden. Die noch vorhandenen Golgikomplexe sind etwas geschrumpft. Die Zahl der Golgi-Sacculi ist vermindert, die Golgi-Vakuolen jedoch sind nicht reduziert. Zahlreiche, meist sehr große Vakuolen treten in den Präparaten hervor.

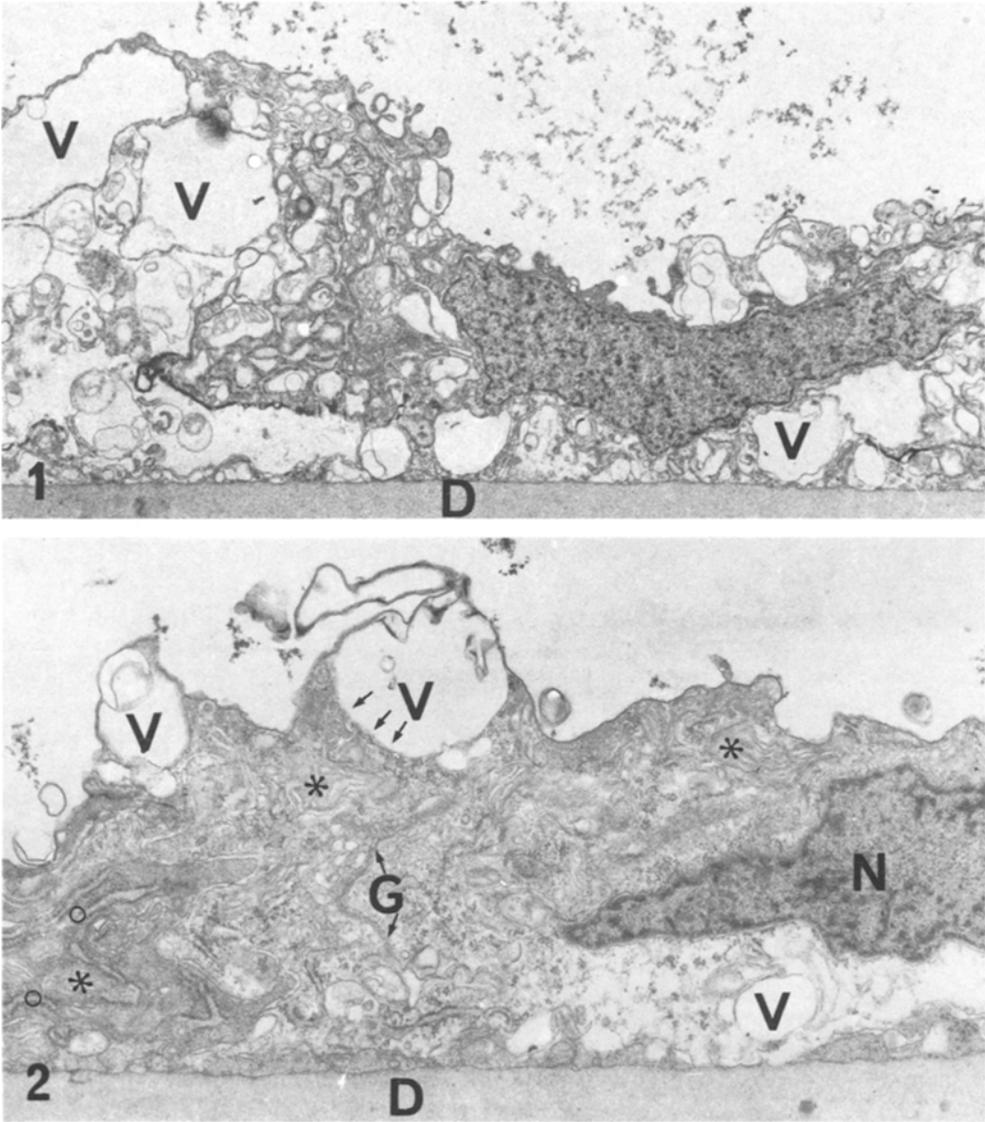


Abb. 1 und 2. Endothel einer Kaninchenhornhaut nach Gefrierkonservierung mit 5% Dextran T40. Stark irreguläre Zelloberflächen mit Verlust des "terminal web". Ausgeprägte Vakuolisierung (V) und Cytoplasmaverlust in den schlecht konservierten Zellen (**Abb. 1**). Die Mitochondrien (*) sind zum Teil geschwollen und aufgebrochen und zeigen partielle Matrixverluste. Das endoplasmatische Retikulum (o) ist nicht klar erkennbar. In den gut erhaltenen Zellen (**Abb. 2**) sind große Vakuolen (V) vor allem unter der Oberfläche sichtbar. Die Cytoplasmamembran ist teilweise von der Zelloberfläche abgelöst (Pfeile). ER (o), Golgi-Komplex (G) und Mitochondrien (*) erscheinen größtenteils intakt. N Kern, D Descemet-Membran. Vergr. **Abb. 1** 7500fach, **Abb. 2** 14 600fach

Die Interzellularräume sind meist normal weit. Der Kontakt des Endothels mit der Descemet-Membran ist immer vorhanden. Eu- und Heterochromatin zeigen Verteilungsmuster, die normalen unbehandelten Endothelzellen entsprechen. An den Kernmembranen können keine sichtbaren Schäden festgestellt werden.

2. Konservierung in 10% Polyvinylpyrrolidon (Abb. 3 und 4)

Ungefähr die Hälfte der Endothelzellen, die mit 10%igem Polyvinylpyrrolidon gefrierkonserviert wurden, zeigen stärkste Läsionen. Die Zelloberfläche ist meist irregulär. Zahlreiche Membranbruchstücke, die an manchen Stellen noch mit der oberflächlichen Plasmamembran in Verbindung stehen, können im Bereich der vorderen Augenkammer beobachtet werden.

Die Mitochondrien dieser Gruppe sind meist geschwollen und nehmen runde Form an. Andere Mitochondrien wiederum enthalten sehr dicht anfärbbare Strukturen kondensierter Matrix (Abb. 3).

Die Cisternen des endoplasmatischen Retikulums sind extrem erweitert, besonders in den mehr basalen Descemet-nahen Teilen.

Die Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums sind regulär angeordnet. Freie Ribosomen werden in allen Endothelzellen beobachtet. Die Golgi-Systeme überleben die Gefrierkonservierung nach dieser Methode gut und zeigen kaum Veränderungen ihrer Konfiguration.

Bei den meisten Präparaten führt die Behandlung zu einer starken Vakuolisierung der Zellen. Dabei treten Vakuolen ohne und mit umgrenzter Membran auf. Während ersteres meist auf einen partiellen Verlust der Zellmatrix zurückzuführen ist, wird letzteres durch extreme Schwellung von Zellorganellen hervorgerufen.

Die Zellkerne sind häufig ziemlich oberflächennah lokalisiert, es sind jedoch keine Veränderungen zu erkennen, die auf eine stärkere Schädigung hinweisen.

3. 5% Dextran T40 + 10% Polyvinylpyrrolidon + Dimethylsulfoxid (Abb. 5 und 6)

Nach der Konservierung in Lösung 3 zeigt der größte Teil der Endothelzellen nur geringe Zeichen grober Schädigung. Die Zellen sind an der Descemet-Membran fixiert, ihr Cytoplasma ist homogen gefärbt. Die "terminal webs" sind gut konserviert und zeigen eine reguläre Breite.

Obwohl die Mitochondrien zum Teil geringfügig geschwollen erscheinen, sind die meisten von ihnen intakt. Gelegentlich kann ein partieller Verlust der Cristae beobachtet werden, der zur Abnahme der Elektronendichte dieser Mitochondrien führt (Abb. 5).

Das endoplasmatische Retikulum ist zum größten Teil stark geschwollen, an einigen Stellen führt dies zur Bildung großer Vakuolen. In diesen Fällen sind dann auch die Ribosomen abgestoßen. Am übrigen rauhen endoplasmatischen Retikulum ist die Konfiguration der Ribosomen normal. Freie Ribosomen finden sich im gesamten Cytoplasma verteilt, wie dies auch an unbehandelten Endothelien der Fall ist. Die Sacculi des Golgi-Systems erscheinen in vielen Präparaten sehr erweitert, so daß seine typische lamelläre Struktur nicht erkannt wird.

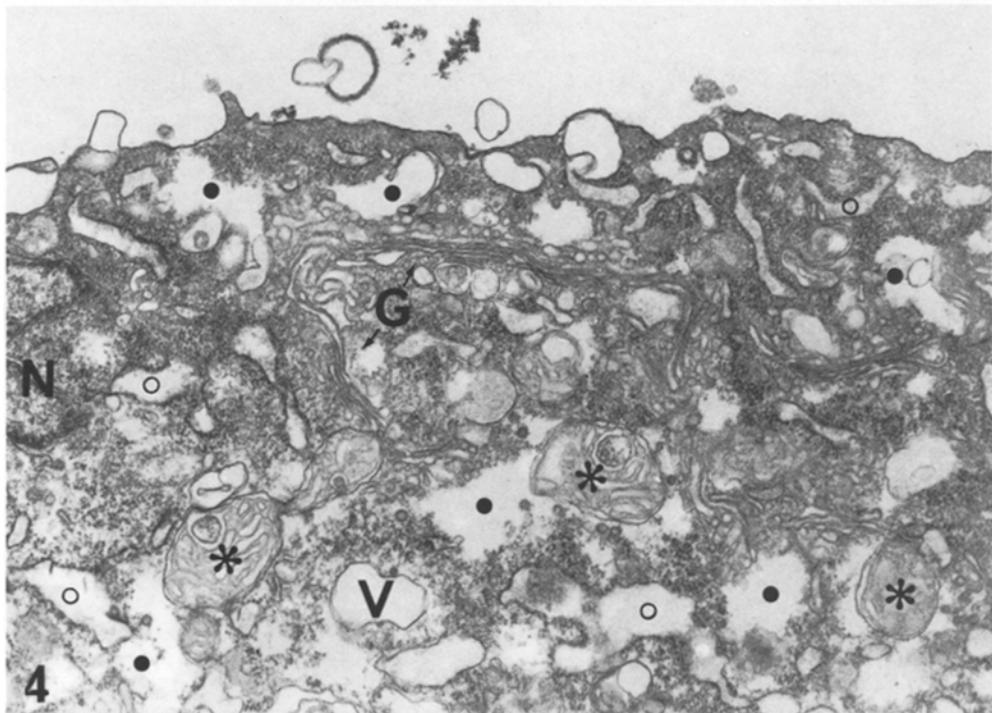
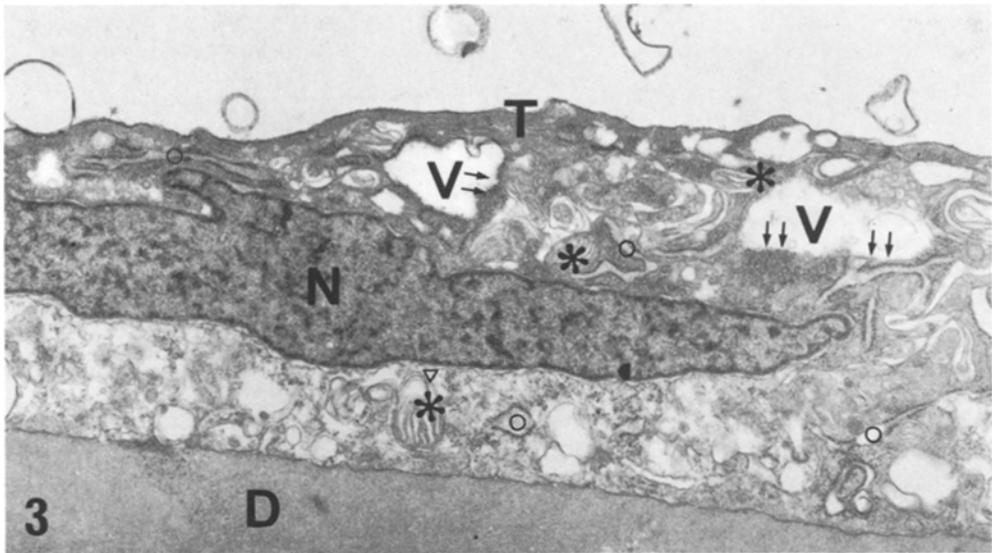


Abb. 3 und 4. Hornhautendothel nach Gefrierkonservierung mit 10% PVP. Ein "terminal web" (*T*) ist nur noch teilweise erhalten. Zahlreiche Vakuolen (*V*), teils ohne begrenzende Membran (*Pfeile*), sind über das Cytoplasma verteilt. Die Cytoplasmamatrix zeigt große Substanzverluste (*●*). Die meisten Mitochondrien (***) sind geschwollen, zum Teil sind sie aufgebrochen und haben Matrixdefekte (*△*). Das endoplasmatische Retikulum (*○*) ist erweitert. Der Golgi-Apparat (*G*) ist gut konserviert. Die Zelloberfläche ist uneben, zahlreiche Membranablösungen können beobachtet werden. *D* Descemet-Membran, *N* Kern. Vergr. **Abb. 3** 13 500fach, **Abb. 4** 15 600fach

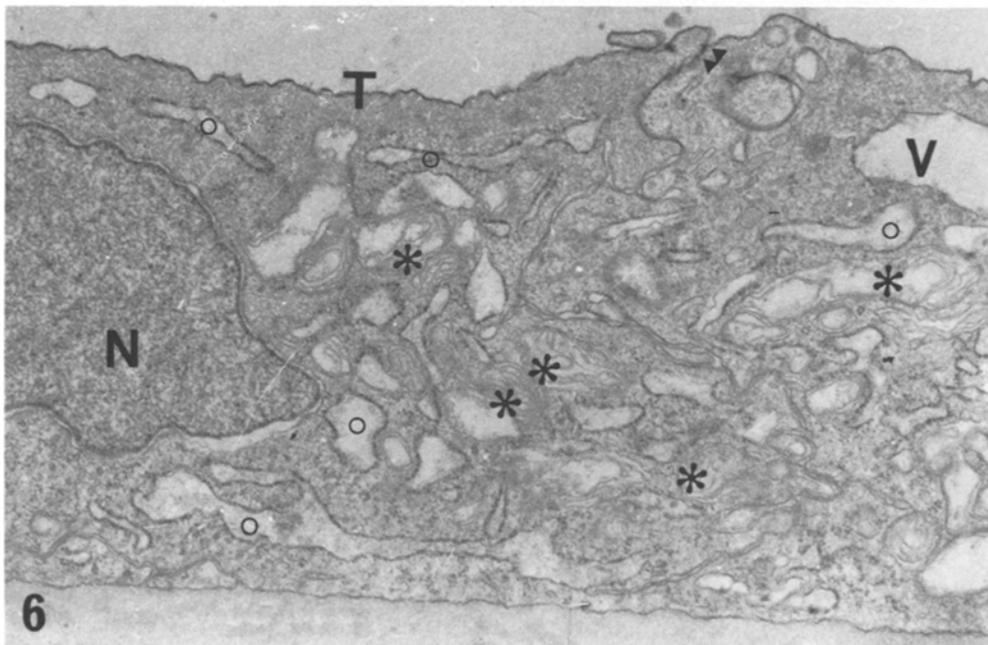
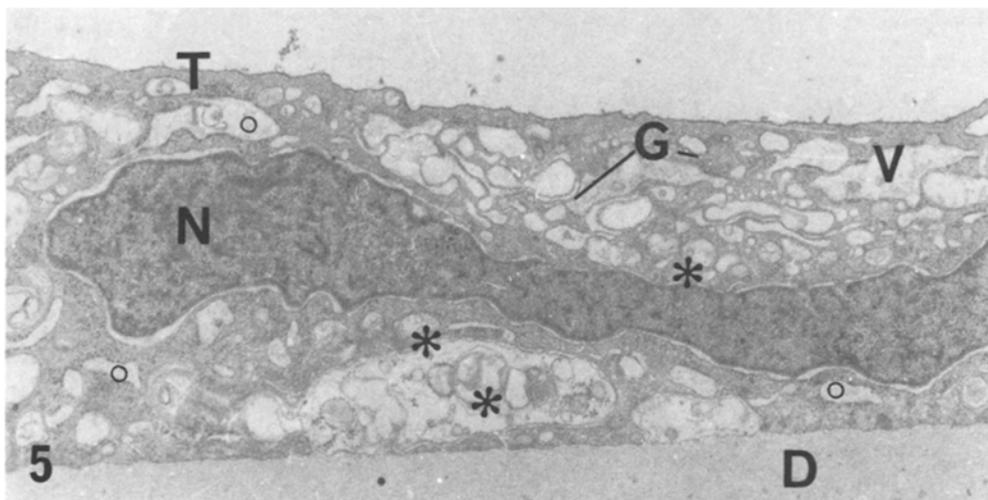


Abb. 5 und 6. Hornhautendothel nach Gefrierkonservierung mit 5% Dextran T40, 10% PVP und DMSO (Lösung 3). **Abb. 5** repräsentiert die Gruppe der schlechter, **Abb. 6** die der besser konservierten Zellen. In beiden Abb. ist unter der relativ ebenen Zelloberfläche ein "terminal web" (T) erhalten. Vakuolen (V) unterschiedlicher Größe sind im Cytoplasma verteilt. Die Mitochondrien (*) sind größtenteils intakt. Der Golgi-Komplex (G) ist extrem geschwollen. Die Cisternen des endoplasmatischen Retikulums (o) sind erweitert und führen zu Vakuolisierung. Der Kern (N) ist intakt, der perinucleäre Spalt vergrößert. Die Endothelzellen haben kontinuierlichen Kontakt mit der Descemet-Membran (D). (▲) Zonula occludens. Vergr. **Abb. 5** 14 000fach, **Abb. 6** 15 600fach

Eine deutliche Vakuolisierung tritt auch in dieser Gruppe auf. Die Vakuolen sind jedoch auf Schwellung des endoplasmatischen Retikulums und der Golgi-Sacculi zurückzuführen, nicht aber auf Matrixverlust oder erweiterte Interzellularräume, diese erscheinen normal breit.

Das Chromatin einiger Endothelzellkerne erscheint nicht klar, im übrigen gleicht es jedoch der Struktur frischen, unbehandelten Endothels.

Die Kernmembranen zeigen häufig partiell mäßige Erweiterungen.

4. 25% Kaninchenserumalbumin + 10% Polyvinylpyrrolidon (Abb. 7 und 8)

Werden diese beiden Lösungen als Gefrierschutzmittel kombiniert, so ist ein Großteil der Endothelzellen total oder teilweise zerstört. Neben Zellen mit extremer Schwellung können auch Schrumpfungsprozesse an einigen Stellen beobachtet werden.

Ein "terminal web" ist in den meisten Fällen nicht mehr erkennbar. Membranablösungen und partielle Verluste des oberflächlichen Cytoplasmas lassen die Zellkerne oft dicht unter die Oberfläche treten.

Die Fraktion der Mitochondrien bietet ein buntes Bild. In den relativ gut konservierten Zellen sind die Mitochondrien geschwollen, ihre Konfiguration erscheint jedoch häufig normal. Einige sind rupturiert und haben ihre Matrix verloren. An anderen Stellen treten Mitochondrien auf, die durch ihre dichte Färbbarkeit auffallen.

Die lamellären Strukturen der Golgi-Apparate sind gut erhalten, die Sacculi bieten kaum Zeichen starker Läsionen und ihre Cisternen sind nicht erweitert.

Der größte Teil des endoplasmatischen Retikulums zeigt nur geringe Erweiterung und ist normal geformt. Die Ribosomen liegen der Doppelmembran in gewohnter Weise an. Freie Ribosomen sind in allen Zellen vorhanden.

Die Vakuolisierung im Cytoplasma ist bei diesen konservierten Präparaten sehr ausgeprägt. Viele Vakuolen treten in der Descemet-nahen Region auf und zeigen zum Teil riesige Ausmaße.

Die lateralen Zellmembranen sind an einigen Stellen aufgebrochen und formen große Räume. "Tight junctions" können zwar beobachtet werden, erscheinen jedoch in vielen Fällen nicht mehr intakt und fragmentiert.

Das Chromatin stellt sich meist klar dar, bei einigen Ausnahmen ist eine reduzierte Färbbarkeit nachweisbar. Die Kernmembranen zeigen, abgesehen von kleinen partiellen Ausweitungen, normale Formen.

5. 25% Kaninchenserumalbumin + Dimethylsulfoxid (Abb. 9 und 10)

Bei 25%igem Kaninchenserumalbumin und Dimethylsulfoxid als Gefrierschutzlösung treten nur an wenigen Endothelzellen Zeichen starker Läsionen durch den Konservierungsprozeß auf. Die Zellen sitzen fest der Descemetmembran auf und ihre Oberflächenstrukturen bieten keine Anhaltspunkte für größere Zerstörungen.

An der Zelloberfläche ist in allen Fällen eine intakte Plasmamembran vorhanden.

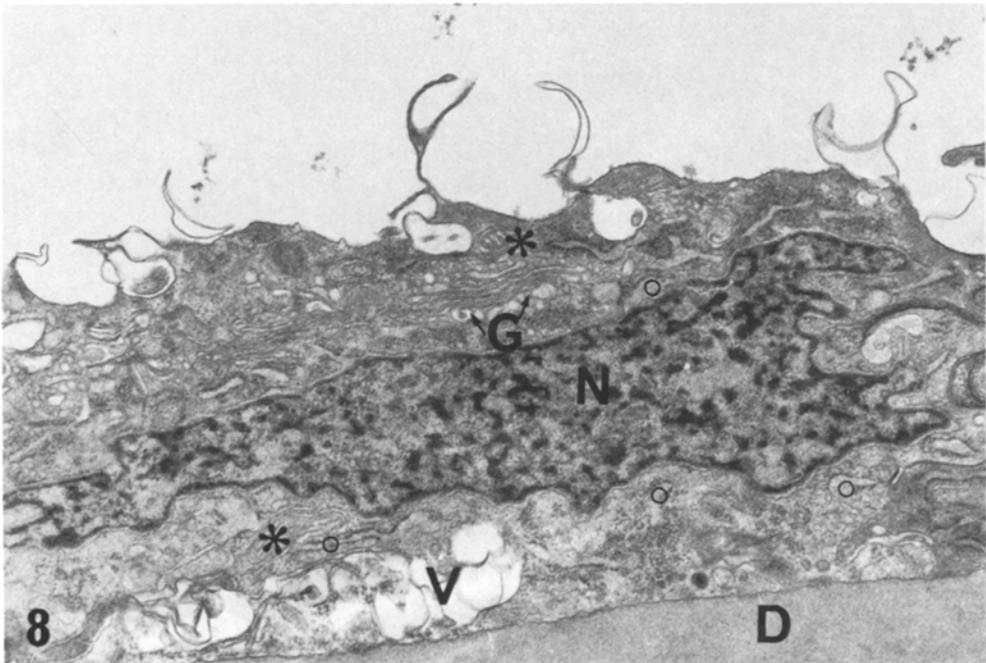
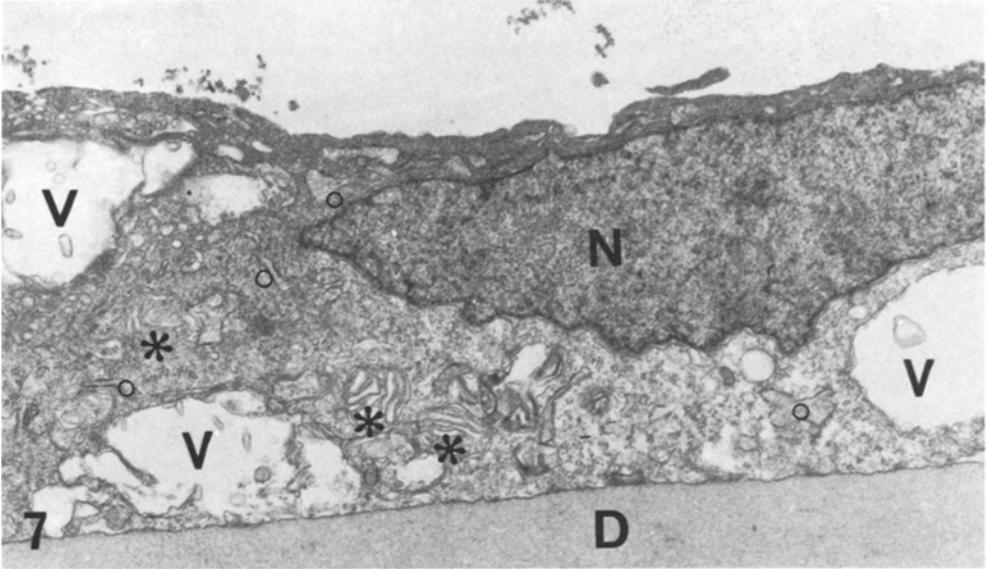


Abb. 7 und 8. Kaninchenhornhautendothel nach Gefrierkonservierung mit 25% Kaninchenserumalbumin und 10% PVP (Lösung 4). Die Zelloberflächen sind stark zerstört. Membranfragmente ragen in die vordere Augenkammer. Verlust der "terminal web". Entstehung zum Teil riesiger Vakuolen (V). Schwellung der Mitochondrien (*), Bruch der Doppelmembran und Matrixverluste (Pfeil). Golgi-Apparat (G) und endoplasmatisches Retikulum (o) normal konfiguriert. N Kern, D Descemet-Membran. Vergr. **Abb. 7** 13000fach, **Abb. 8** 16500fach

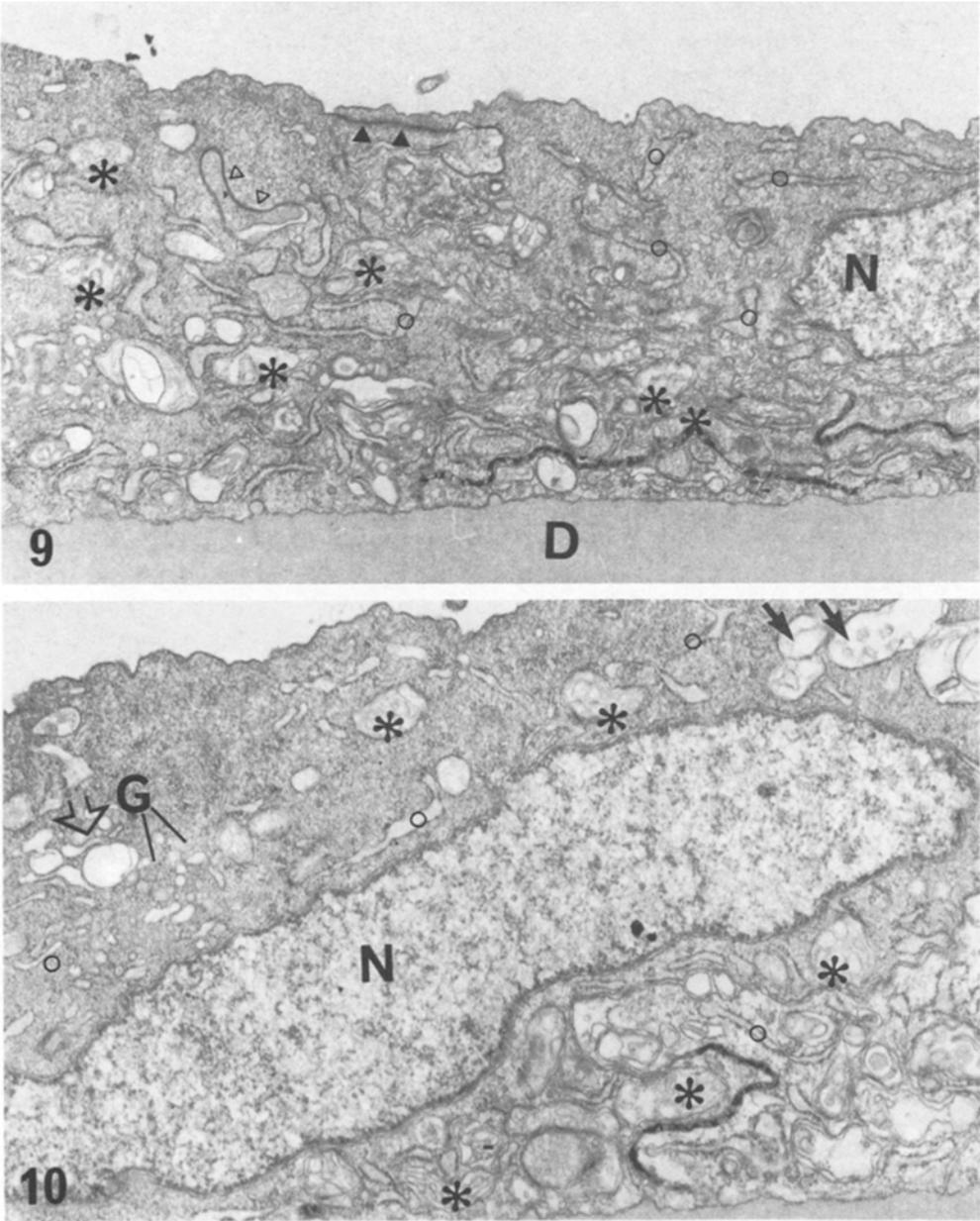


Abb. 9 und 10. Endothelzellen gefrierkonservierter Kaninchenhornhäute [25% KSA und DMSO (Lösung 5)]. Ein "terminal web" ist nicht klar sichtbar. Die Zelloberflächen sind komplett mit einer Plasmamembran bedeckt. Zonula occludens (▲) und Macula occludens (△) sind gut erhalten. Die meisten Mitochondrien (*) haben normale Cristae und dichte Matrixräume, einige zeigen partielle Matrixverluste (*Pfeil*). Die Cisternen des endoplasmatischen Retikulums (○) sind unauffällig. Die Sacculi des Golgi-Apparates (*G*) sind erweitert und bilden kleine Vakuolen (*breiter Pfeil*). Die Zellkerne (*N*) weisen eine geringe Elektronendichte auf. Der Kontakt mit der Descemet-Membran (*D*) ist immer vorhanden. Vergr. **Abb. 9** 15 600fach, **Abb. 10** 16 000fach

Viele Mitochondrien zeigen normale Konfiguration, einige von ihnen weisen partielle Matrixverluste auf oder sind geschwollen. Die Doppelmembran ist in den meisten Fällen vorhanden.

Der größte Teil des endoplasmatischen Retikulums ist unauffällig. Nur die Enden des Membransystems schwellen durch die Behandlung häufig an. Die Ribosomen liegen den Membranen dicht an, können aber auch als freie Ribosomen über das Cytoplasma verteilt beobachtet werden.

Die Sacculi der Golgi-Apparate sind in vielen Fällen vergrößert. Ihre Endabschnitte sind oft so angeschwollen, daß sie Vakuolen bilden. Die Golgi-Vesikel besitzen normale Struktur und sind beidseits der Membransysteme lokalisiert. Die Vakuolisierung ist stärker als in den frisch fixierten Präparaten ausgeprägt. Die Vakuolen entstammen hauptsächlich einer Erweiterung der Golgi-Sacculi.

Auffallend bei den nach diesem Verfahren konservierten Präparaten ist die Anreicherung der Zellorganellen in den der Descemetmembran zugewandten zwei Dritteln. Im oberflächlichen Drittel der Zellen nimmt die Anzahl stark ab und eine fein granuliert Matrix tritt deutlich in Erscheinung. Das Cytoplasma zeigt in den meisten Fällen homogene Färbbarkeit.

Die Interzellularräume sind normal weit. Die Zonulae occludentes erscheinen intakt.

Die Struktur des Chromatins erscheint aufgelockert. Die Kernhülle ist unauffällig, es sind keine Zeichen größerer Läsionen vorhanden.

Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß bei der Anwendung verschiedener Gefrierschutzlösungen bzw. deren Kombinationen unterschiedlich starke Schutzeffekte erzielt werden können. Tabelle 2 gibt einen Überblick und eine Zusammenfassung über die in den fünf Testreihen erhaltenen Ergebnisse.

Da die Versuchsanordnung und -ausführung bei allen Testreihen gleich war, sind die unterschiedlichen Ergebnisse sicherlich nicht durch die angewandte Konservierungstechnik zu interpretieren.

In klinischen Untersuchungen erwies sich diese Methode, die Capella et al. (1965) in der jetzigen Form entwickelten, für die Praxis als sehr brauchbar, wengleich die zahlreichen Störmöglichkeiten, die verfahrensbedingt sind, berücksichtigt werden müssen.

Der geringe Gefrierschutzeffekt von Dextran für kernhaltige Säugetierzellen wurde bereits in einer Studie mit Zellen von chinesischen Hamstern von Ashwood-Smith u. Warby (1971 b) festgestellt. Sie benutzten dabei Dextranlösungen mit Molekulargewichten von 10 000 bis 500 000 und verglichen die Ergebnisse mit einer Kontroll-Lösung ohne Gefrierschutzeffekt und mit DMSO als Zusatz. Während mit DMSO eine Überlebensrate der konservierten Zellen von 73,5% erzielt wurde, lag sie bei den verschiedenen Dextranlösungen zwischen 0,1% und 0,2%, ähnlich auch bei der Kontrollgruppe. Unsere licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Hornhautendothel bestätigen diese Ergebnisse.

Tabelle 2. Morphologische Veränderungen am Hornhautendothel

Gefrierschutz- lösungen	1 5% Dextran T 40	2 10% PVP	3 5% Dextran T 40 10% PVP DMSO	4 25% KSA 10% PVP	5 25% KSA DMSO
Zelloberfläche:					
a) irregulär	+++	++	+	+++	±
b) rupturiert	++	+++	±	++	∅
Zellorganellen:					
Mitochondrien					
a) Schwellung	++	+++	+	+	±
b) Matrixverluste	+++	++	+	+	±
ER: Schwellung					
Golgi-Komplex	+	+++	++	++	±
a) Schrumpfung	+	∅	∅	∅	∅
b) Schwellung	∅	±	+++	±	+
Vakuolenbildung:					
Partieller Cytoplasmazerfall	+++	+++	+	+++	±
	+++	++	+	++	±

+++ = sehr stark; ++ = stark; + = mäßig; ± = sehr wenig; ∅ = fehlt

Experimente mit Kaninchen-Erythrozyten und *Pseudomonas* F8 durch Ashwood-Smith u. Warby (1971 a, b) zeigen jedoch, daß auch mit Dextran Gefrierschutzeffekte erzielt werden können, daß aber offenbar eine Abhängigkeit von Zellart und Spezies besteht.

Strukturelle Beobachtungen an Hornhäuten, die mit 10%igem Polyvinylpyrrolidon konserviert waren, können Polyvinylpyrrolidon als adäquate Gefrierschutzlösung für diese Gewebe nicht bestätigen. Durch Zusatz von Serumalbumin lassen sich zwar die Schäden vermindern, das mikroskopische Bild läßt jedoch auch bei dieser Gruppe eine erfolversprechende klinische Anwendung nicht möglich erscheinen. Zu weite Schwankungen im Molekulargewicht der verwendeten Lösungen sind nach Untersuchungen von Ashwood-Smith et al. (1972) häufig die Ursache hierfür. Ob jedoch eine Dialyse unserer Polyvinylpyrrolidon-Lösung einen besseren Gefrierschutzeffekt bewirkt hätte, wie dies bei Untersuchungen von Ashwood-Smith u. Warby (1971 b) an Bakterien der Fall war, bleibt dahingestellt, zumal es bei Experimenten mit anderen Geweben ohne Effekt blieb (Ashwood-Smith et al., 1972).

Dimethylsulfoxid erweist sich nach Auswertung unserer elektronenmikroskopischen Untersuchungen als geeignetste Gefrierschutzkomponente. Beim Vergleich der Experimente an anderen Zellsystemen (Ashwood-Smith u. Warby, 1971 a; Fishbein, 1971; Klein et al., 1967; Leibo u. Mazur, 1971) mit unseren Beobachtungen kann der universelle Schutzeffekt des DMSO bestätigt werden.

Enttäuschend erscheint das Ergebnis der Hornhäute, die in einer Kombination aus einer penetrierenden Lösung, DMSO und nicht penetrierenden Komponenten, Dextran und Polyvinylpyrrolidon, konserviert waren. In der Annahme, daß der

Gefrierschutzeffekt dieser beiden Gruppen auf verschiedene Wirkungsmechanismen zurückzuführen ist, würde man eine Addition dieser beiden Effekte erwarten, die aber offenbar, wie unsere Ergebnisse zeigen, nicht eintritt. Es läßt sich eher vermuten, daß der Schutzeffekt des Dimethylsulfoxids zu diesem Ergebnis führt, wemgleich der Beweis hierfür aussteht.

Die Autoren danken Fr. Chr. Schunck für wertvolle technische Mitarbeit.

Literatur

- Ashwood-Smith, M.J., Warby, C.: A species of *Pseudomonas*, a most useful bacterium for cryobiological studies. *Cryobiology* **8**, 208 (1971 a)
- Ashwood-Smith, M.J., Warby, C.: Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of Polyvinylpyrrolidone and Dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology* **8**, 453 (1971 b)
- Ashwood-Smith, M.J., Warby, C., Connor, K.W., Becker, G.: Low temperature preservation of mammalian cells in tissue culture with Polyvinylpyrrolidone (PVP), Dextrans, and Hydroxyethyl starch (HES). *Cryobiology* **9**, 441 (1972)
- Capella, J.A.: Techniques of cryopreservation. In: Corneal preservation. Clinical and laboratory evaluation of current methods (J.A. Capella, H.F. Edelhauser, D.L. Van Horn, eds.). Springfield: Thomas 1973
- Capella, J.A., Kaufman, H.E., Robbins, J.E.: Preservation of viable corneal tissue. *Cryobiology* **2**, 116 (1965)
- Caulfield, J.B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 827 (1957)
- Fishbein, W.N.: Studies on the mechanism of freezing damage to mouse liver using a mitochondrial enzyme assay. III. Cryophylaxis with dimethyl sulfoxide and enzyme localization. *Cryobiology* **8**, 293 (1971)
- Klein, E., Lyman, R.B. Jr., Peterson, L., Berger, R.I., Smith, G.K.: Effect of dimethyl sulfoxide on lipoproteins stored at low temperatures. *Cryobiology* **3**, 328 (1967)
- Leibo, S.P., Mazur, P.: The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology* **8**, 447 (1971)
- Luft, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409 (1961)
- Mishima, S., Kudo, T.: In vitro incubation of rabbit cornea. *Invest. Ophthalm.* **6**, 329 (1967)
- Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high p_H as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208 (1963)
- Trenberth, S.M., Mishima, S.: The effect of ouabain on the rabbit corneal endothelium. *Invest. Ophthalm.* **7**, 44 (1968)
- Waller, W.: Gefrierkonservierung der Hornhaut. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **163**, 739 (1973)
- Watson, M.L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 475 (1958)

Eingegangen am 29. Mai 1978