

Einfluss der Nukleationstemperatur und der Konzentration an Frierschutzmitteln auf die Kryokonservierung humaner Zellen

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Ing. Ralf Spindler, M.Sc.
geboren am 22. Mai 1971 in Neuwied

2012

1. Referentin: Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher

2. Referent: Prof. Dr.-Ing. Lutz Rissing

weiteres Mitglied: Prof. Dr.-Ing. Bodo Rosenhahn

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr.-Ing. Dr.h.c. Horst Kruse

Tag der Promotion: 21. September 2012

VORWORT

Die vorliegende Arbeit ist aus meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mehrphasenprozesse der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover hervorgegangen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Institutsleiterin Frau Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, M.Sc. Bereits während meines Studiums ermöglichte sie mir weitreichende Kontakte zu Forschern innerhalb der *Society for Cryobiology* und *Society for Low Temperature Biology*. Meine anschließende wissenschaftliche Arbeit hat sie intensiv begleitet, immer gefördert und stets konstruktiv bewertet.

Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. Dr.h.c. Horst Kruse, Herrn Prof. Dr.-Ing. Lutz Rissing und Herrn Prof. Dr.-Ing. Bodo Rosenhahn für das freundliche Interesse, das sie meiner Arbeit als Prüfungsvorsitzender, Referent und weiteres Prüfungmitglied entgegengebracht haben.

Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Bodo Rosenhahn für die freundliche Zusammenarbeit bei der automatischen Video-Analyse kryomikroskopischer Aufnahmen. Ebenfalls danke ich den Kooperationspartnern Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller vom Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover und Frau Dr.-Ing. Denise Freimark vom Institut für Biopharmazeutische Technologie der Fachhochschule Giessen.

Großer Dank gebührt allen Kolleginnen und Kollegen für die Unterstützung und die angenehme Atmosphäre. Frau Dr. rer. nat. Nicola Hofmann und Herrn Dr. Ir. Wim Wolkers danke ich für die fachliche Unterstützung während meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Inga Bernemann, Maryam Akhoondi, Christoph Stoll, Huan Sun und Lutz Dreyer, deren Unterstützung mir fachlich und menschlich viel bedeutet.

Die am Projekt beteiligten Studierenden haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt Shu Yu, Sabrina Jauch, Holger Zernetsch, Janna Aumann, Cristiane Andrade Bier, Navid Manuchehrabadi, Jing Wang, Lihua Wang, Jan-Philipp Schmidtman, Johannes Voß, Amanda Teoh, Haiyong Chen, Lena Heidelberg, Lena Steding, Steven Ndzengue, Helge

IV

Schöps, Roman Bieniek, Caroline Rieper und Jörn Hesse. Für die technische Unterstützung danke ich Dipl.-Ing. (FH) Almer Meinken, dem Werkstattleiter André Papke und Julia Struss.

Für die finanzielle Förderung der Arbeit gilt der Dank dem Exzellenzcluster REBIRTH.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Frau Daniela und meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung.

Hannover, im Juli 2012

Ralf Spindler

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Ziele der Arbeit und Gliederung..... | 3 |
| 3 | Grundlagen und Stand der Forschung..... | 5 |
| 3.1 | Thermodynamik der Kryokonservierung..... | 5 |
| 3.1.1 | Nukleation und Eiskristallwachstum..... | 5 |
| 3.1.2 | Phasendiagramme..... | 13 |
| 3.1.3 | Eigenschaften von Frierschutzmitteln..... | 16 |
| 3.2 | Kryokonservierung von Zellen..... | 19 |
| 3.2.1 | Zell-Dehydrierung..... | 19 |
| 3.2.2 | Intrazelluläre Eiskristallbildung..... | 21 |
| 3.2.3 | Zellvitalität nach der Kryokonservierung..... | 23 |
| 3.3 | Stand der Forschung und Technik..... | 28 |
| 3.3.1 | Methoden zur theoretischen Beschreibung des Wärme- und Stofftransports .. | 28 |
| 3.3.2 | Methoden zur Kontrolle der Nukleationstemperatur | 30 |
| 3.3.3 | Einfluss der Nukleationstemperatur auf das zelluläre osmotische Verhalten .. | 35 |
| 3.3.4 | Einfluss der Toxizität von Frierschutzmitteln auf die Überlebensrate..... | 36 |
| 3.3.5 | Einfluss von Frierschutzmitteln auf das zelluläre osmotische Verhalten | 38 |
| 4 | Theoretische Untersuchungen..... | 40 |
| 4.1 | Wärmetransport..... | 40 |
| 4.1.1 | Simulation der Temperaturverteilung | 40 |
| 4.1.2 | Temperaturverteilung dünnschichtiger Proben bei der Kryomikroskopie..... | 41 |
| 4.1.3 | Temperaturverteilung zylinderförmiger Proben in Kryoröhrchen..... | 42 |
| 4.1.4 | Temperaturverteilung dünnschichtiger Proben bei der FTIR | 45 |
| 4.2 | Stofftransport..... | 47 |
| 4.2.1 | Transportmodell der Kryokonservierung von Zellen..... | 47 |
| 4.2.2 | Numerische Methode zur Lösung der Gleichungen..... | 48 |
| 4.2.3 | Simulation des Wassertransports | 49 |
| 5 | Experimenteller Aufbau und Methoden | 51 |
| 5.1 | Dünnschichtige Zellsuspensionen..... | 51 |
| 5.1.1 | Kryomikroskopie..... | 51 |
| 5.1.2 | Verbesserte Bilderfassung und -analyse | 53 |
| 5.1.3 | Konstruktion und Realisierung eines Nukleators..... | 56 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.1.4 | Versuchsdurchführung Nukleator | 58 |
| 5.2 | Zylinderförmige Zellsuspensionen..... | 59 |
| 5.2.1 | Coulter Counter-Technik..... | 59 |
| 5.2.2 | Konstruktion und Realisierung eines Frierblocks | 60 |
| 5.2.3 | Versuchsdurchführung Frierblock..... | 61 |
| 5.3 | Dünnschichtige Zellpellets | 64 |
| 5.3.1 | Fourier-Transform Infrarotspektroskopie von 10°C bis 90°C | 64 |
| 5.3.2 | Fourier Transform Infrarotspektroskopie von 10°C bis -45°C | 65 |
| 5.3.3 | Kryomikroskopie mit Zellpellets | 66 |
| 6 | Ergebnisse | 67 |
| 6.1 | Effekte auf die Eiskristallbildung..... | 67 |
| 6.1.1 | Eiskristallbildung im H ₂ O-Band | 67 |
| 6.1.2 | Extrazelluläre Eiskristallbildung ohne intrazelluläre Eiskristallbildung..... | 68 |
| 6.1.3 | Extrazelluläre Eiskristallbildung mit intrazellulärer Eiskristallbildung..... | 68 |
| 6.2 | Effekte auf das Zell-Volumen | 75 |
| 6.2.1 | Freeze-Induced Swelling..... | 75 |
| 6.2.2 | Geringe Konzentrationen an Frierschutzmittel | 76 |
| 6.2.3 | Totzeit und Post-Thaw Swelling | 80 |
| 6.3 | Effekte auf Proteine und Membranen | 81 |
| 6.3.1 | Denaturierungstemperatur von Proteinen..... | 81 |
| 6.3.2 | Zellmembranen bei Temperaturen von 10°C bis 90°C | 82 |
| 6.3.3 | Zellmembranen bei Temperaturen von 10°C bis -45°C..... | 83 |
| 6.4 | Effekte auf die Überlebensrate | 88 |
| 7 | Verleich zwischen Theorie und Praxis | 90 |
| 8 | Diskussion der Ergebnisse | 93 |
| 8.1 | Zell-Dehydrierung..... | 93 |
| 8.2 | Extrazelluläre Eiskristallbildung | 98 |
| 8.3 | Intrazelluläre Eiskristallbildung | 99 |
| 8.4 | Einfluss der Untersuchungsmethoden auf die Ergebnisse | 101 |
| 9 | Zusammenfassung und Ausblick | 102 |
| 10 | Anhang | 107 |
| 10.1 | Ergänzende Abbildungen und Tabellen | 107 |
| 10.2 | Probenvorbereitung für Endothelzellen-Experimente..... | 108 |
| 10.3 | Bestimmung der osmotischen Zell-Parameter | 109 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 10.3.1 | Osmolalitätsmessung von Frierschutzmitteln | 109 |
| 10.3.2 | Boyle Van´ t Hoff-Diagramme und osmotisch inaktives Volumen..... | 110 |
| 10.3.3 | Hydraulische Konduktivität und Aktivierungsenergie..... | 113 |
| 10.4 | Bestimmung der Membran-Integrität und Vitalität von Zellen | 113 |
| 10.5 | Neu entwickelte Programme | 116 |
| 10.6 | Liste der betreuten studentischen Arbeiten (2008-2012) | 119 |
| 10.7 | Liste der Paper, Abstracts, Vorträge, Poster, Erfindungen, Preise (2007-2012).... | 121 |
| 11 | Literaturverzeichnis..... | 127 |

VERZEICHNIS VERWENDETER FORMELZEICHEN, INDICES UND ABKÜRZUNGEN

Formelzeichen

| | | |
|-------------|---------------------------------|---|
| a | m | Radius einer Pore in einer Zellmembran |
| A | m^2 | effektive Zellmembran-Oberfläche |
| B | K/min | Kühlrate |
| c_{CPA} | mol/L | Frierschutzmittelkonzentration |
| c_p | $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$ | spezifische Wärmekapazität (isobar) |
| C | mol/L | Konzentration (Gleichung 3.23 und 3.24) |
| C_{limit} | mol/L | limitierende Frierschutzmittelkonzentration |
| d | m | Bereich der konstitutionellen Unterkühlung |
| D | $m^2 \cdot s^{-1}$ | Diffusionskoeffizient der Lösung |
| E | V/m | elektrische Feldstärke |
| E_{Lp} | $J \cdot mol^{-1}$ | Aktivierungsenergie |
| G | J | Gibbs-Energie; Freie Enthalpie |
| G | K/mm | Temperaturgradient |
| I | $s^{-1} \cdot m^{-2}$ | Nukleationsrate |
| k | - | Verteilungskoeffizient |
| k_i | - | i-ter Runge-Kutta-Koeffizient |
| K | $K \cdot kg \cdot osmol^{-1}$ | kryoskopische Konstante |
| L | J/mol | Latentwärme (Gleichung 3.39) |
| L_p | $m^3 \cdot N^{-1} \cdot s^{-1}$ | hydraulische Membran-Konduktivität |
| L_{pg} | $m^3 \cdot N^{-1} \cdot s^{-1}$ | Referenz Membran-Konduktivität |
| M | osmol/kg | Osmolalität |
| n | - | Anzahl der H ₂ O-Moleküle im Cluster |
| n_i | mol | Stoffmenge |
| N | - | Anzahl der Komponenten im System |
| N | - | totale Anzahl der H ₂ O-Moleküle (Gleichung 3.4 und 3.5) |
| N | - | Anzahl der Zellen (Gleichung 3.34 bis 3.37) |
| p | N/m^2 | Druck |
| P_{CPA} | cm/min | Frierschutzmittel-Permeabilitäts-Koeffizient [137] |

| | | |
|--------------|---------------------------------|--|
| Pe | - | Peclet-Zahl |
| PIF | - | Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung |
| qv^* | - | Verhältnis der Molarität von Wasser zur Molarität der polaren Gruppen einer Frierschutzmittel-Lösung |
| r | m | Radius eines Eisclusters |
| R | $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ | allgemeine Gaskonstante ($R = 8,314472 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$) |
| R | - | Verhältnis der Konzentrationen von Additiv zu NaCl |
| R | - | Wiederfindungsrate (Gleichung 3.37) |
| R | μm | Radius eines Partikels |
| S | J/K | Entropie |
| S | - | Zell-Überlebensrate |
| t | s | Zeit |
| t_{tot} | s | Totzeit |
| T | $^{\circ}C$ | Temperatur |
| T_g | $^{\circ}C$ | Glasübergangstemperatur |
| T_h | $^{\circ}C$ | homogene Nukleationstemperatur |
| T_{IIF} | $^{\circ}C$ | gemittelte Nukleationstemperatur der intrazellulären Eiskristallbildung |
| T_m | $^{\circ}C$ | Schmelztemperatur; Gleichgewichtsfriertemperatur |
| T_n | $^{\circ}C$ | Nukleationstemperatur; Eiskeimbildungstemperatur |
| T_R | K | Referenztemperatur (273,15 K) [10] |
| T_s | $^{\circ}C$ | Solidustemperatur |
| T^0 | $^{\circ}C$ | Schmelztemperatur von planarem Eis |
| v | m/s | Geschwindigkeit |
| v_c | m/s | kritische Geschwindigkeit |
| v_{rel} | - | auf V_0 normiertes Zell-Volumen |
| V | m^3 | Zell-Volumen |
| V_b | m^3 | Osmotisch inaktives Zell-Volumen |
| V_c | m^3 | Volumen des Eisclusters |
| V_{cv} | m^3 | Osmotisch aktives Zell-Volumen |
| V_0 | m^3 | Isotonisches Zell-Volumen |
| W | J | Arbeit eines Custers aus H_2O -Molekülen |
| x | m | Ortskoordinate |
| ΔH_f | J/mol | Latentwärme von Wasser |

X

| | | |
|---------------|--------------------------------------|--|
| ΔT | K | Temperatur-Schrittweite des Runge-Kutta-Verfahrens |
| ΔT | K | Gefrierpunktsdepression einer wässrigen Lösung |
| $\Delta\mu_c$ | J/mol | Differenz des chemischen Potentials an Kristall-Oberfläche |
| γ | J/m ² | Oberflächenspannung |
| ϵ_0 | A·s·V ⁻¹ ·m ⁻¹ | Dielektrizitätszahl des Vakuums |
| ϵ_w | - | Dielektrizitätszahl von Wasser |
| ϵ_i | - | Dielektrizitätszahl von Eis |
| η | kg·m ⁻¹ ·s ⁻¹ | Viskosität |
| θ | ° | Kontaktwinkel |
| κ | K ⁵ | thermodynamischer Parameter im SCN-Modell |
| λ | W·m ⁻¹ ·K ⁻¹ | Wärmeleitfähigkeit |
| ϕ_s | J | Oberflächenenergie der Substrat/Wasser-Grenzfläche |
| $\phi_{s,0}$ | J | Oberflächenenergie der Substrat/Wasser-Grenzfläche |
| ϕ_{el} | J | elektrostatische Feldenergieänderung bei Eisclusterbildung |
| μ | J/mol | chemisches Potential |
| ν | m ³ /mol | molares Volumen |
| ρ | kg/m ⁻³ | Massendichte |
| σ | - | Reflexionskoeffizient |
| ψ_s | - | Dissoziationskonstante |
| Ω | m ⁻² ·s ⁻¹ | kinetischer Parameter im SCN-Modell |

Indices

| | |
|------|-------------------------|
| 0 | isotonische Bedingungen |
| 1 | vor der Nukleation |
| 2 | nach der Nukleation |
| c | Eiskristall |
| corr | korrigiert |

| | |
|--------------|---|
| <i>cryo</i> | kryokonservierte Zellen |
| <i>e</i> | extrazellulär |
| <i>ex</i> | Überschuss (engl.: excess) |
| <i>i</i> | intrazellulär |
| <i>l</i> | Liquidus |
| <i>liq</i> | flüssiger Anteil |
| <i>opt</i> | optimal |
| <i>s</i> | Solidus |
| <i>total</i> | vitale und nicht-vitale Zellen (Abschnitt 3.2.3) |
| <i>total</i> | flüssiger und fester Anteil (Gleichung 3.39 und 3.40) |
| <i>vital</i> | vitale Zellen |
| <i>w</i> | Wasser |
| * | kritischer Wert zur Bildung eines Eisclusters |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| AM | Acetoxymethylester |
| ATC | automatische Temperaturregelung (engl.: automatic temperature control) |
| CaF | Kalziumfluorid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CPA | Frierschutzmittel (engl.: cryoprotective agent) |
| DMEM | Standardisiertes Zellkultur-Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) |
| DSC | Dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry) |
| DPPC | Dipalmitoylphosphatidylcholin |
| ECGS | Wachstumsfaktoren für Endothelzellen (engl.: endothelial cell growth supplement) |
| EG | Ethylenglycol |
| EIF | extrazelluläre Eiskristallbildung (engl.: extracellular ice formation) |
| FBS | Fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum) |
| FIS | gefrier-induziertes Anschwellen (engl.: freeze-induced swelling) |
| FEM | Finite-Elemente-Methode |
| FTIR | Fourier-Transform Infrarotspektroskopie |

XII

| | |
|--------------------|---|
| HES | Hydroxyethylstärke |
| Me ₂ SO | Dimethylsulfoxid (DMSO) |
| I _C | kubisches Eis |
| I _H | hexagonales Eis |
| IIF | intrazelluläre Eiskristallbildung (engl.: intracellular ice formation) |
| I _V | vitrifiziertes Eis |
| KCl | Kaliumchlorid |
| LN ₂ | Flüssigstickstoff |
| MCT | Quecksilber/Cadmium/Tellurid (engl.: mercury/cadmium/telluride) |
| N ₂ | Stickstoff |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Nd:Yag | Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat |
| INA | Mittel zur Eis-Nukleation (engl.: ice nucleation agent) |
| H ₂ O | Wasser |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline) |
| Pen/Strep | Penicillin Streptomycin |
| PTFE | Polytetrafluorethylen (Teflon [®]) |
| RGT | Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur (van't Hoff-Regel) |
| RT | Raumtemperatur |
| SCN | durch die Zelloberfläche katalysierte Nukleation (surface catalyzed nucleation) |
| SIB | synthetische Eis-Blocker (engl.: synthetic ice blocker) |
| TEP | Produkte der Gewebezüchtung (engl.: tissue-engineered product) |
| VCN | durch das Zell-Volumen katalysierte Nukleation (volume catalyzed nucleation) |
| WTM | Wassertransportmodell |

KURZFASSUNG

Spindler, Ralf

Einfluss der Nukleationstemperatur und der Konzentration an Frierschutzmitteln auf die Kryokonservierung humaner Zellen

Gegenwärtig ist die Kryokonservierung die einzige Methode zur Langzeitlagerung von Zellen und Geweben, welche die Morphologie, Funktionalität und Vitalität der biologischen Proben für medizinische Anwendungen erhält. Insbesondere gewinnt die kryogene Lagerung in den aufstrebenden Gebieten der regenerativen und personalisierten Medizin zunehmend an Bedeutung. Obwohl die Lagerung von Zellen in Kryobanken bereits etabliert ist, treten bei vielen Zelltypen sowie bei allen räumlich ausgedehnten Proben Schädigungsmechanismen auf, die die Überlebensrate der Zellen drastisch senken. Die zellulären Schädigungen können verfahrenstechnisch durch die Kontrolle einer Vielzahl von Prozessparametern beeinflusst werden, um die Überlebensrate der Zellen zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss der Prozessparameter Nukleationstemperatur und Frierschutzmittelkonzentration auf die Kryokonservierung von humanen Endothelzellen der Lunge untersucht. Es werden zwei Hypothesen aufgestellt: Erstens, mittlere Frierschutzmittelkonzentrationen führen zu einem extremen zellulären Schrumpfen und zweitens, bei optimaler Einstellung der Nukleationstemperatur kann die Frierschutzmittelkonzentration verringert werden. Nach der messtechnischen Bestimmung der osmotischen Parameter werden zunächst Simulationen des Wärme- und Stofftransportes durchgeführt. Die experimentellen Untersuchungen werden mit verschiedenen Messtechniken bewerkstelligt: Mit der Kryomikroskopie wird die zelluläre Volumenänderung und die Eiskristallbildung während der Kryokonservierung erfasst. Die Coulter Counter-Technik wird genutzt, um osmotische Effekte bei hohen Temperaturen zu erfassen. Zusätzlich wird die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR) eingesetzt, um den Einfluss des Gefrierens auf zelluläre Membranen und Proteine zu bestimmen. Zwei Geräte-Konstruktionen ermöglichten dabei die automatisierte Kontrolle der Nukleationstemperatur - ein Nukleator für kryomikroskopische Proben sowie ein Frierblock für acht parallel angeordnete Proben. Aus den Ergebnissen wird ein neues Modell entwickelt, das das osmotische Verhalten von humanen Endothelzellen qualitativ beschreibt.

Schlagwörter: Kryokonservierung, Kryomikroskopie, Nukleationstemperatur, FTIR

ABSTRACT

Spindler, Ralf

Influence of nucleation temperature and concentration of cryoprotective agents on the cryopreservation of human cells

Currently, cryopreservation is the only method for the long term storage of cells and tissue which maintains the morphology, functionality and vitality of biological samples for medical applications. In particular, the cryogenic storage becomes increasingly important in the emerging areas of regenerative and personalized medicine. Although the storage of cells is already established in cryobanks, a lot of cell types as well as all spatially expanded samples have mechanisms of injuries which drastically decrease the survival rate. Cellular injuries can be procedurally controlled by a multitude of process parameters to increase the cell survival rate.

Within the scope of this study, the effects of the process parameters, nucleation temperature and cryoprotective agent concentration on cryopreservation of human pulmonary endothelial cells are investigated. It is hypothesized: First, intermediate concentrations of cryoprotective agents result in extreme cellular shrinkage and second, optimum adjustment of the nucleation temperature can reduce the concentration of cryoprotective agents. After measuring the osmotic parameters simulations of heat and mass transfer are performed. Experimental investigations are done by using different measuring techniques: Cellular volume change and ice crystal formation during cryopreservation are measured by cryomicroscopy. Osmotic effects at high temperatures are acquired by Coulter Counter technique. Furthermore, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is used to determine effects of cellular membranes and proteins during freezing. Two system-constructions allow for the automatic control of the nucleation temperature - a nucleator for cryomicroscopic samples as well as a freezing block for eight parallel arranged samples. From the results a new model is developed which qualitatively describes the osmotic behavior of human endothelial cells.

Keywords: cryopreservation, cryomicroscopy, nucleation temperature, FTIR

1 EINLEITUNG

Bei der Lagerung von Materialien spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle: Die Lagerungstemperatur definiert die Haltbarkeit des Materials, indem sie Einfluss auf die Reaktionskinetik nimmt. Allgemein nimmt die Geschwindigkeit chemischer Prozesse bei tieferen Temperaturen ab. Für biologische Systeme gilt die von van't Hoff angegebene Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel), nach der eine Erniedrigung der Temperatur um 10 K eine Verringerung der Stoffwechselrate von biologischen Reaktionen um das Zwei- bis Dreifache bewirkt [201]. Eine Senkung der Stoffwechselrate führt zu einer Verlangsamung der Alterungsprozesse der biologischen Systeme und deren Langzeitlagerung wird bei tiefen Temperaturen ohne Qualitätsverlust möglich.

Die Kryokonservierung beschäftigt sich mit der Langzeitlagerung von biologischem Material bei kryogenen Temperaturen. Als interdisziplinäre Disziplin nutzt sie einerseits Verfahren der Kryotechnik, die zur Kälteerzeugung¹ Temperaturen von circa -123°C bis -273°C bereitstellen kann. Andererseits sind Erkenntnisse der Kryobiologie erforderlich, um die Auswirkungen der Kälte auf das biologische Material vorherzusagen. Das Ziel der Kryokonservierung ist, biologische Materialien wie Zellen und Gewebe bei kryogenen Temperaturen zu lagern und dabei deren Morphologie, Funktionalität und Vitalität nach der Wiedererwärmung zu erhalten. Während die Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur von H_2O bei -135°C unkritisch ist, können beim Durchlaufen höherer Temperaturen Zell-Schädigungen entstehen, die die Qualität mindern. Zu den Schädigungsmechanismen gehören unter anderem die intrazelluläre Eiskristallbildung, Kälteschock und Lösungseffekte.

Verfahrenstechnisch kann der Prozess der Kryokonservierung durch Einstellung von einer Vielzahl von Prozessparametern optimiert werden, um zelluläre Schädigungen zu verhindern. Beim Gefrieren von Zellen existieren verschiedene Zelltyp-abhängige Prozessparameter, darunter die Kühlrate, die Heizrate, die Nukleationstemperatur und die Konzentration an Frierschutzmitteln. Während für viele Zelltypen in Parameterstudien bereits optimale Frierprotokolle gefunden wurden und hohe Überlebensraten erreicht wurden [24], existieren eine Reihe von wichtigen Zelltypen, die bisher nicht erfolgreich kryokonserviert werden konnten, darunter Spermien und Eizellen verschiedener Spezies und einige Blutzellen wie

¹ Obwohl in der Kryotechnik der Begriff "Kälteerzeugung" gebräuchlich ist, kann beim Kühlen eines Kühlguts keine Kälte zugeführt, sondern allenfalls Wärme abgeführt werden.

Thrombozyten und polymorphkernige Leukozyten [188], [66]. Darüber hinaus können Gewebe mit unterschiedlichen Zelltypen nur in Ausnahmefällen unter Erhaltung der Vitalität eingefroren werden [53]. Verfahrenstechnisch können derzeit Gewebe nur mit Schichtdicken im Bereich von Millimetern erfolgreich kryokonserviert werden [39], [158], da bei größeren Proben zum einen eine notwendige homogene Temperaturverteilung nicht mehr im ausreichenden Maße gegeben ist und zum anderen unter Nutzung von Frierschutzmitteln Probleme mit deren Toxizität [183] und Permeabilität [25] auftreten. Eine aktuelle Herausforderung in der Forschung besteht darin, die bisherigen Limitierungen der Kryokonservierung zu erweitern: Dies wird unter anderem durch die Entwicklung neuer Techniken erreicht, die die Prozessparameter kontrollieren und bestehende Frierprotokolle optimieren können. Während zur Kontrolle der Nukleationstemperatur das indirekte Elektrofreenzing entwickelt wurde [155], konnte gezeigt werden, dass im Fall von nicht-permeierenden Frierschutzmitteln deren Konzentration mittels reversibler Elektroporation einstellbar ist [82]. Die Anwendung solcher Techniken führt jedoch in der Regel nur zu einer Erhöhung von Überlebensraten einzelner Zelltypen. Im Gegensatz dazu führt die Erforschung von Grundlagen in der Kryokonservierung zu einem tieferen Verständnis der auftretenden Schädigungsmechanismen.

In dieser Arbeit werden unter anderem folgende grundlegende Fragestellungen im Bereich der Kryokonservierung behandelt:

- Wie wirkt sich die extrazelluläre Eiskristallbildung auf die intrazelluläre Eis-Nukleation aus?
- Kann die Dosis an Frierschutzmitteln verringert werden, wenn eine Eis-Nukleation aktiv eingeleitet wird?
- Wie verhalten sich Zellen während eines optimalen Einfrier-Auftau Prozesses?

Eine Erkenntnisgewinnung aufgrund solcher ursächlichen Fragestellungen führt oftmals zu neuartigen kryobiologischen Methoden, wie die Nutzung von Kaspase-Inhibitoren [19] und der Einsatz von hyperaktiven Anti-Frost-Proteinen [154]. Diese ermöglichen eine Verbesserung der Kryokonservierung von mehrzelligen Systemen wie natives und tissue-engineertes Gewebe.

2 ZIELE DER ARBEIT UND GLIEDERUNG

Die Kryokonservierung dient der medizinischen Bereitstellung von biologischen Proben wie vitale Zellen und Gewebe, indem sie deren Lagerung bei tiefen Temperaturen ermöglicht. Während die kryogene Lagerung von Gameten, Embryonen und Nabelschnurblut in Kryobanken bereits kommerzialisiert ist, zeichnet sich ein erhöhter Bedarf in dem aufstrebenden Forschungsbereich der regenerativen und personalisierten Medizin ab. Insbesondere müssen die neu entwickelten Produkte der Gewebezüchtung (engl.: tissue-engineered products, TEPs), darunter bioartifizielle und künstliche Organ-Modelle, für eine lückenlose Versorgungskette von ihrer Entstehung bis zum Patienten gelagert werden können [58]. Viele der hierbei eingesetzten Zelltypen können bisher nicht mit hoher Überlebensrate kryokonserviert werden, sodass ein hoher Forschungsbedarf besteht.

Die vorliegende Arbeit entsteht im Rahmen des Exzellenzclusters *Rebirth* (engl. Akronym: from regenerative biology to reconstructive therapy), das auf dem Gebiet der regenerativen Biologie und der rekonstruktiven Therapien tätig ist. Vor diesem Hintergrund erfolgt die Entscheidung, die experimentellen Untersuchungen an humanen Endothelzellen der Lunge (engl.: human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC) durchzuführen, um daraus neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Kryokonservierung zu gewinnen. Aufgrund von Voruntersuchungen in aufwändigen Parameterstudien sind zu Beginn der Arbeit einige optimale Prozessparameter für diesen Zelltyp bereits bekannt, wobei diese optimalen Prozessparameter mit einer Kühlrate von 5 K/min und einer Frierschutzmittelkonzentration von 5 Vol.-% Me₂SO bestimmt sind [80]. Zusätzlich wurde der Einfluss der Nukleationstemperatur bei Kühlraten zwischen 1 und 5 K/min für wenige andere Zelltypen von Petersen ermittelt [157]. Er wies mit humanen Fibroblasten nach, dass die optimale Nukleationstemperatur eine geringe Abhängigkeit von der Kühlrate besitzen kann. Mit diesen Vorkenntnissen entsteht das besondere Interesse, das zelluläre Verhalten im Bereich des Parameter-Optimums zu untersuchen.

Die Aufgabe ist, den Einfluss der Prozessparameter Nukleationstemperatur und Frierschutzmittelkonzentration auf die Kryokonservierung von HPMEC-Zellen in der Nähe des bekannten Parameter-Optimums zu erforschen. Es werden zwei Hypothesen aufgestellt: Erstens, die Konzentration an Frierschutzmitteln bewirkt bei mittleren Konzentrationen ein extremes Dehydrieren der Zellen und zweitens, durch eine optimale Einstellung der Nukleationstemperatur kann die Frierschutzmittelkonzentration verringert werden.

Zunächst sollen die zellulären osmotischen Parameter, darunter die hydraulische Konduktivität und die Aktivierungsenergie der HPMEC-Zellen, bestimmt werden. Diese werden in Kapitel 3 innerhalb der „Grundlagen“ und „Stand der Technik“ näher erläutert. Im Kapitel 4 werden Simulationen der Temperaturverteilung mittels FEM-Analysen beschrieben. Diese sollen zeigen, wie die Wärme von den wässrigen Proben an die jeweiligen Probenhalter in den experimentellen Aufbauten abgeführt werden. Um das zelluläre osmotische Verhalten bei geringen Kühlraten zu analysieren, soll eine Simulation des Stofftransportes unter Nutzung eines Wassertransportmodells (WTM) durchgeführt werden.

Die experimentellen Aufbauten und Methoden sind nach der Geometrie der Proben geordnet und in Kapitel 5 dargestellt. Verschiedene Methoden der Kryomikroskopie müssen genutzt werden, um das osmotische Verhalten wie Volumenänderungen und intrazelluläre Eiskristallbildung von HPMEC-Zellen optisch zu charakterisieren. Für die Kryomikroskopie soll ein Nukleator konstruiert werden, der eine automatisierte Nukleation dünnschichtiger mikroskopischer Proben ermöglicht. Zur Untersuchung zylinderförmiger Zellsuspensionen soll bei hohen Temperaturen zur Bestimmung des Zell-Volumens die Coulter Counter-Technik eingesetzt werden und bei tiefen Temperaturen soll ein automatisches Einfriergerät genutzt werden. Hierzu muss ein Peltier-Element-basierter Frierblock entwickelt werden, der die Nukleation von 8 parallel angeordneten Proben in kommerziell erhältlichen Kryoröhrchen gleichzeitig auslösen kann. An dünnschichtigen Zellpellets soll die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie bei hohen und bei tiefen Temperaturen eingesetzt werden. Aus den Infrarotspektren lassen sich die Effekte beim Einfrieren der HPMEC-Zellen auf deren Membranen und Proteine ableiten. Die Ergebnisse werden in Kapitel 6 geschildert: Es wird der Einfluss der untersuchten Prozessparameter auf die intra- und extrazelluläre Eiskristallbildung, Änderungen des Zell-Volumens, zelluläre Proteine und Membrane und der Überlebensrate der HPMEC-Zellen nach der Kryokonservierung erläutert. Dabei werden bisher unbekannte Effekte beim Einfrieren und Auftauen beschrieben, wie der Freeze-induced Swelling-Effekt. Ein Vergleich zwischen den theoretischen und praktischen Untersuchungen liefert Kapitel 7. Die Ergebnisse werden in Kapitel 8 diskutiert und in einem neu entwickelten Modell zusammengefügt, das die erforschten Effekte qualitativ beschreiben kann. Dieses Modell beschränkt sich grundsätzlich nicht nur auf die hier erforschten humanen Endothelzellen, sondern liefert einen generellen Beitrag zum Verständnis der Kryokonservierung von humanen Zellen.

3 GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG

3.1 Thermodynamik der Kryokonservierung

3.1.1 Nukleation und Eiskristallwachstum

Wird eine wässrige Lösung unterhalb ihrer Gleichgewichts-Friertemperatur T_m abgekühlt, so wird sich der flüssige oder der energetisch günstigere kristalline Zustand einstellen. Im thermodynamischen Gleichgewicht nimmt dabei die zugehörige Gibbs-Energie G ein Minimum an (Abb. 3.1). Voraussetzung für den Phasenwechsel von flüssig nach kristallin ist eine Nukleation des Wassers, bei der sich ein genügend großer Eiskeim bildet, an dem sich weitere H_2O -Moleküle anlagern können. Ohne Nukleation befindet sich die wässrige Lösung bei Temperaturen unterhalb von T_m in einem metastabilen, unterkühlten (engl.: supercooled) Zustand. Die Wahrscheinlichkeit für eine Nukleation bei der Nukleationstemperatur T_n wächst mit steigender Unterkühlung $\Delta T = T_m - T_n$ bis zur maximalen möglichen Unterkühlung bei der homogenen Nukleationstemperatur T_h der Lösung. Reines Wasser kann beispielsweise unter atmosphärischem Druck bis maximal auf $\sim -39,5^\circ\text{C}$ unterkühlt werden, was an kleinen Wasser-Tropfen mit einem Volumen von wenigen Mikrolitern beobachtet wurde [26].

Der stochastische Prozess der Nukleation kann eindeutig durch die *primäre* und *sekundäre Nukleation* unterschieden werden, welche ohne bzw. im Kontakt zu Kristallen erfolgt. Eine Unterteilung ist in Abb. 3.2 dargestellt. Hierin wird die primäre Nukleation in die *homogene* und *heterogene Nukleation* untergliedert. Die sekundäre Nukleation kann auch durch einen Flüssigkeitsstrom (Scherung), durch eine Interaktion mit einem Partikel (Bruch, Reibung) oder durch eine Spaltung eines Partikels (Nadel) ausgelöst werden.

Mit Hilfe der klassischen Nukleationstheorie können die verschiedenen Nukleations-Arten quantitativ beschrieben werden. Hierzu wird die Gibbs-Energie genutzt, die im Allgemeinen von der Temperatur T , dem Druck p und den Stoffmengen n_i der beteiligten N Komponenten des beschriebenen Systems abhängig ist. Aus dem totalen Differential der Gibbs-Energie

$$dG = \frac{\partial G}{\partial T} \cdot dT + \frac{\partial G}{\partial p} \cdot dp + \sum_{i=1}^N \frac{\partial G}{\partial n_i} \cdot dn_i \quad (3.1)$$

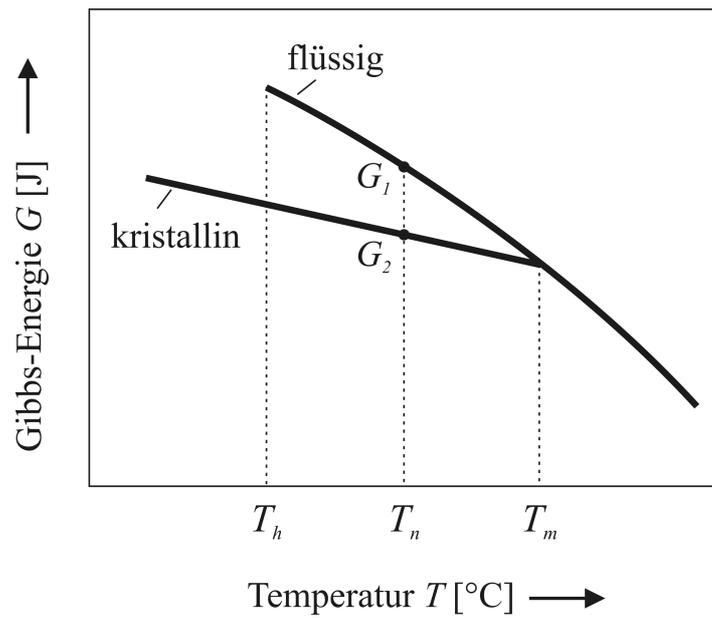


Abb. 3.1: Qualitative Darstellung der Gibbs-Energie einer wässrigen Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur im thermischen Gleichgewicht [13].

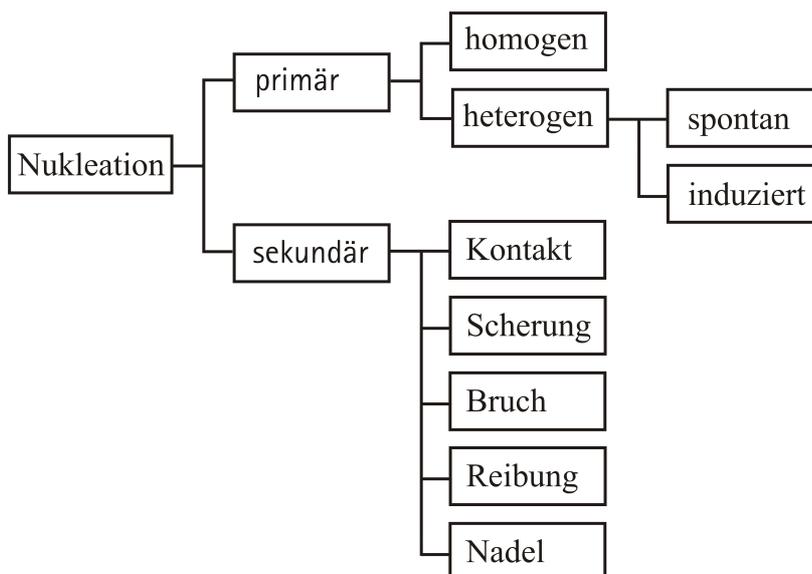


Abb. 3.2: Einteilung der Nukleation-Arten nach [89] mit der Erweiterung der Unterscheidung zwischen spontaner und induzierter Nukleation.

ergibt sich die Fundamentalgleichung der Thermodynamik [15]

$$dG = -S \cdot dT + V \cdot dp + \sum_{i=1}^N \mu_i \cdot dn_i \quad (3.2)$$

mit der Entropie S , dem Volumen V und den chemischen Potentialen μ_i der Komponenten.

Eine Nukleation, die aus einem Eiskeim besteht, der sich nur im Kontakt mit unterkühlten Wasser befindet, heißt *homogene Nukleation* und tritt bei der homogenen Nukleationstemperatur T_h auf. Dabei wird ein Cluster beschrieben, der aus n H₂O-Molekülen besteht. Die Arbeit $W(n)$ zur Bildung dieses Clusters wird definiert als [93]:

$$W(n) \equiv G_2(n) - G_1 \quad (3.3)$$

Die Indizes 1 und 2 beziehen sich auf die Zustände vor bzw. nach der Nukleation. Die Gibbs-Energien können nach Gleichung 3.2 unter Annahme konstanter Temperatur und konstantem Druck mit Hilfe der chemischen Potentiale und beteiligten Moleküle ausgedrückt werden:

$$G_1 = N \cdot \mu_1 \quad (3.4)$$

$$G_2(n) = (N - n) \cdot \mu_1 + n \cdot \mu_2 + G_{ex}(n) \quad (3.5)$$

Hierin ist N die Anzahl der H₂O-Moleküle. $G_{ex}(n)$ beschreibt eine Überschussenergie, die I) die Oberfläche des Clusters, II) die Änderung des Druckes im Cluster und III) die Differenz der chemischen Potentiale beinhaltet. Mit der Definition der Übersättigung $\Delta\mu \equiv \mu_1 - \mu_2$ folgt die allgemeine Gleichung für einen H₂O-Cluster mit n Molekülen für die homogene Nukleation:

$$W(n) = -n \cdot \Delta\mu + G_{ex}(n) \quad (3.6)$$

Eine *heterogene Nukleation* liegt vor, wenn der Eiskeim im unterkühlten Wasser in Kontakt mit einem Fremdkörper ist und die Nukleation bei der Nukleationstemperatur T_n erfolgt, wobei gilt (vgl. [Abb. 3.1](#)):

$$T_h < T_n \leq T_m \quad (3.7)$$

Die heterogene Nukleation tritt, verglichen mit der homogenen Nukleation, häufiger in technischen und biologischen Systemen auf, da sich im unterkühlten Wasser meist Fremdkörper wie mikroskopische Partikel und Blasen befinden. In Glas-Behältern konnte reines Wasser maximal bis $-30 \pm 1^\circ\text{C}$ unterkühlt werden [212].

Für die heterogene Nukleation gilt ebenfalls Gleichung 3.3 und die Gibbs-Energien erhalten im Vergleich zu der homogenen Nukleation zusätzliche Summanden

$$G_1 = N_t \cdot \mu_1 + \{G_s + \phi_{s,0}\} \quad (3.8)$$

$$G_2(n) = (N_t - n) \cdot \mu_1 + n \cdot \mu_2 + G_{ex}(n) + \{G_s + \phi_s(n)\} \quad (3.9)$$

hierin ist G_s die Gibbs-Energie des Fremdkörpers und $\phi_{s,0}$ und $\phi_s(n)$ sind die Oberflächenspannungen für $n = 0$ bzw. $n > 0$. Analog zur Herleitung von Gleichung 3.6 ergibt sich für die heterogene Nukleation die Arbeit $W(n)$ zur Bildung eines Clusters:

$$W(n) = -n \cdot \Delta\mu + G_{ex}(n) + \{\phi_s(n) - \phi_{s,0}\} \quad (3.10)$$

Die *induzierte Nukleation* ist dadurch gekennzeichnet, dass durch das Einbringen einer zusätzlichen Energie ϕ in Gleichung 3.10 ein weiterer Summand hinzukommt. Im Fall des Electrofreezings kann durch Anlegen einer hohen elektrischen Feldstärke E_{el} in der Größenordnung von $\sim 10^9$ V/m an die unterkühlte Lösung eine Nukleation induziert werden [157]. Aus Gleichung 3.10 folgt:

$$W(n) = -n \cdot \Delta\mu + G_{ex}(n) + \{\phi_s(n) - \phi_{s,0}\} + \phi_{el} \quad (3.11)$$

$$\phi_{el}(n) = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_w}{2} \cdot \left(\frac{\epsilon_w}{\epsilon_i} - 1 \right) \cdot V_{c,n} \cdot E^2 \quad (3.12)$$

Hierbei sind ϕ_{el} die elektrostatische Feldenergieänderung bei H₂O-Clusterbildung, ϵ_w , ϵ_i , ϵ_0 die Dielektrizitätszahlen von Wasser, Eis und im Vakuum, $V_{c,n}$ das Volumen des H₂O-Clusters sowie E die externe elektrische Feldstärke.

H₂O-Cluster, die eine geringere Anzahl an Molekülen als die kritische Anzahl n^* besitzen, sind instabil. Beim Erreichen der kritischen Anzahl des H₂O-Clusters mit der kritischen Energie W^* wird dieser *Eiskeim* genannt und es gilt das Nukleations-Theorem in allgemein gültiger Form [94]:

$$\frac{dW^*}{d\Delta\mu} = -n^* \quad (3.13)$$

Für $n > n^*$ ist ein H₂O-Cluster stabil und die weitere Anlagerung von H₂O-Molekülen ist begünstigt, sodass das Cluster-Volumen anwachsen kann.

Alternativ kann die Bildung eines sphärischen Clusters mit einem Volumenanteil der Gibbs-Energie ΔG_V , der Oberflächenspannung γ und dem Radius r beschrieben werden [63], siehe Abb. 3.3, mit

$$\Delta G(T) = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3 \cdot \Delta G_V(T) + 4\pi \cdot r^2 \cdot \gamma \quad (3.14)$$

wobei für die Eisbildung der kritische Radius r^* und die kritische Energie ΔG^* überschritten werden muss. Für diese gilt:

$$r^*(T) = -\frac{2 \cdot \gamma}{\Delta G_v(T)} \quad (3.15)$$

$$\Delta G^*(T) = \frac{16\pi \cdot \gamma^3}{3 \cdot [\Delta G_v(T)]^2} \quad (3.16)$$

Das Wachsen des Eiskristalls geschieht aufgrund eines Transports von H_2O -Molekülen an die Oberfläche des Eiskristalls durch Diffusion. Bestimmt wird dieser Transport durch die Aktivierungsenergie und Viskosität der Schmelze. Beide steigen bei tiefen Temperaturen. Die Folge ist, dass sich der Transport von H_2O -Molekülen zur Eiskristallfront bei tieferen Temperaturen verringert.

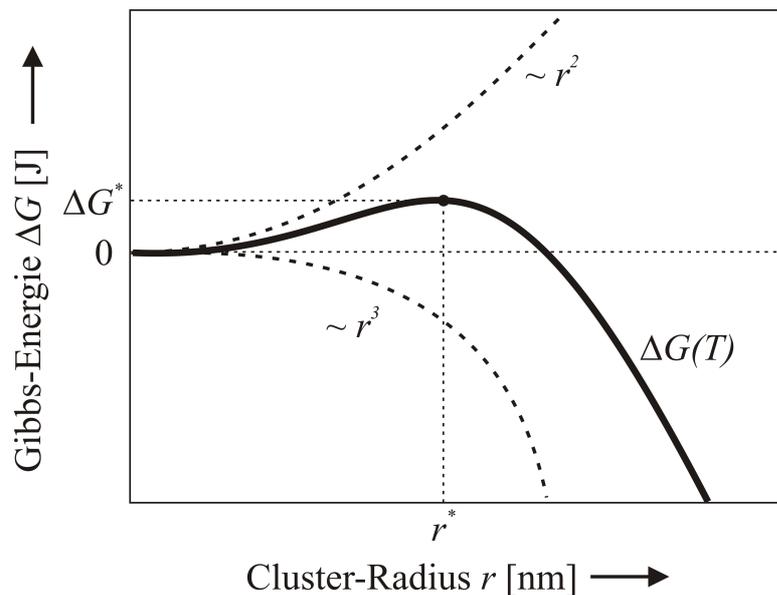


Abb. 3.3: Qualitative Darstellung der Gibbs-Energie zur Bildung eines sphärischen H_2O -Clusters in Abhängigkeit vom Cluster-Radius r [93].

Analog zur Beschreibung der Nukleation wird das Eiskristallwachstum thermodynamisch beschrieben [61]: Die Arbeit $\Delta G_c(T)$ zur Bildung eines Kristalls an einer vorhandenen Eiskristallfront ist gegeben durch:

$$\Delta G_c(T) = -n_c \cdot \Delta \mu_c \quad (3.17)$$

Hierin beschreiben n_c die Anzahl der an den Kristall bindenden H_2O -Moleküle und $\Delta \mu_c$ die Differenz der chemischen Potentiale an der Kristalloberfläche und in einer Entfernung einer mittleren freien Weglänge. Für die Gibbs-Energie $\Delta G(T)$ zur Bildung eines Eiskristalls mit der Höhe a , dem Radius r_c und der Oberflächenspannung γ_c , welcher sich auf einer planaren, vorhandenen Eiskristallfront aufbaut, gilt:

$$\Delta G(T) = \pi \cdot r_c^2 \cdot \Delta G_c(T) + 2\pi \cdot r_c \cdot a \cdot \gamma_c \quad (3.18)$$

Hieraus ergeben sich kritischer Radius und kritische Gibbs-Energie (analog zu Gleichung 3.15 und 3.16) mit $a = 1$ zu:

$$r_c^*(T) = -\frac{\gamma_c}{\Delta G_c(T)} \quad (3.19)$$

$$\Delta G^*(T) = -\frac{\pi \cdot \gamma_c^2}{\Delta G_c(T)} \quad (3.20)$$

Wassermoleküle können sich beim Gefrieren über Wasserstoffbrückenbindungen quasi-tetraederförmig mit 4 bis 4,4 Bindungspartnern anordnen, wobei sich aus dem Eis-Cluster ein Eiskristall mit einer stark ausgeprägten Anisotropie bildet. Diese Anisotropie führt zu einer unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit in den 4 verschiedenen Achsen a_1 , a_2 , a_3 und c des Kristalls (Abb. 3.4a). Während das Kristallwachstum in Richtung der c -Achse nur langsam erfolgt, ist die Wachstumsgeschwindigkeit in Richtung der a -Achsen höher und es entsteht eine flache hexagonale Geometrie des Eiskristalls. Dies ist der Grund, warum Schneekristalle eine hexagonale Geometrie aufweisen. Das hexagonale Eis (engl.: hexagonal ice, I_H) ist unter Normaldruck stabil und ist deshalb die häufigste beobachtbare Struktur bei Eiskristallen. Unter bestimmten Umständen kann jedoch auch eine metastabile Kristallstruktur auftreten – das kubische Eis (engl.: cubic ice, I_C). Kubisches Eis wurde beim Erwärmen im Temperaturbereich von -150°C bis -80°C beobachtet (Abb. 3.4b). Bei Temperaturen um -120°C wandelt es sich langsam in hexagonales Eis um und bei höheren Temperaturen um -70°C ist dieser Umwandlungsprozess beschleunigt. Darüber hinaus kann Eis in nicht-kristalliner, amorpher Struktur existieren und wird dann vitrifiziertes Eis (engl.: vitreous ice, I_V) genannt. Dazu muss reines Wasser sehr schnell abgekühlt werden und dessen Temperatur unterhalb der homogenen Nukleationstemperatur die Glasübergangstemperatur T_g von -135°C erreichen, bevor die Erstarrung des Wassers erfolgt [51].

Beim Erstarren einer wässrigen Lösung werden hauptsächlich Wassermoleküle in den wachsenden Eiskristall eingebaut. Zunächst entsteht hierdurch eine planare Eiskristallfront.

Diese planare Eisfront kann durch die Einlagerung von Fremdmolekülen destabilisiert werden. Hierbei beschreibt der Verteilungskoeffizient k das Verhältnis der Konzentration an Fremdmolekülen auf der festen und flüssigen Seite der Eisfront, mit:

$$k = \frac{C_s|_{x \rightarrow 0^-}}{C_l|_{x \rightarrow 0^+}} \approx 10^{-6} \quad (3.21)$$

Das bedeutet, dass nur circa 1 Fremdmolekül von 1 Millionen H_2O -Molekülen in den wachsenden Eiskristall eingelagert wird. Es ist anzumerken, dass Anionen und Kationen unterschiedliche Verteilungskoeffizienten besitzen und dadurch im Fall von Na^+ - und Cl^- -Ionen eine elektrische Spannung über der Phasenfront entsteht, bekannt unter dem Workman-Reynolds Effekt [107].

Die planare Eisfront kann außerdem durch eine Temperaturerhöhung destabilisiert werden, die während des Einfriervorganges erfolgen kann. Bei der Phasenumwandlung wird die Latentwärme ΔH_f frei. Diese beträgt bei reinem Wasser 6,01 kJ/mol bei 0°C und wird bei tieferen Temperaturen kleiner [63], [48]. Die Entstehung der Latentwärme kann wie folgt beschrieben werden: In der Flüssigphase besitzen die H_2O -Moleküle eine Maxwell'schen Geschwindigkeitsverteilung. Bei der Anlagerung an Eiskristallen (sekundäre Nukleation) binden sich bevorzugt langsame H_2O -Moleküle an den Eiskristall. Dadurch steigt die mittlere Geschwindigkeitsverteilung der restlichen H_2O -Moleküle in der Schmelze, wodurch die Latentwärme frei wird. Wird die Latentwärme nicht schnell genug abgeführt, kommt es zu einem Temperaturanstieg. Abb. 3.5 zeigt den prinzipiellen, zeitlichen Temperaturverlauf von reinem Wasser (a) und einer wässrigen Lösung (b) beim Einfrieren und beim Auftauen.

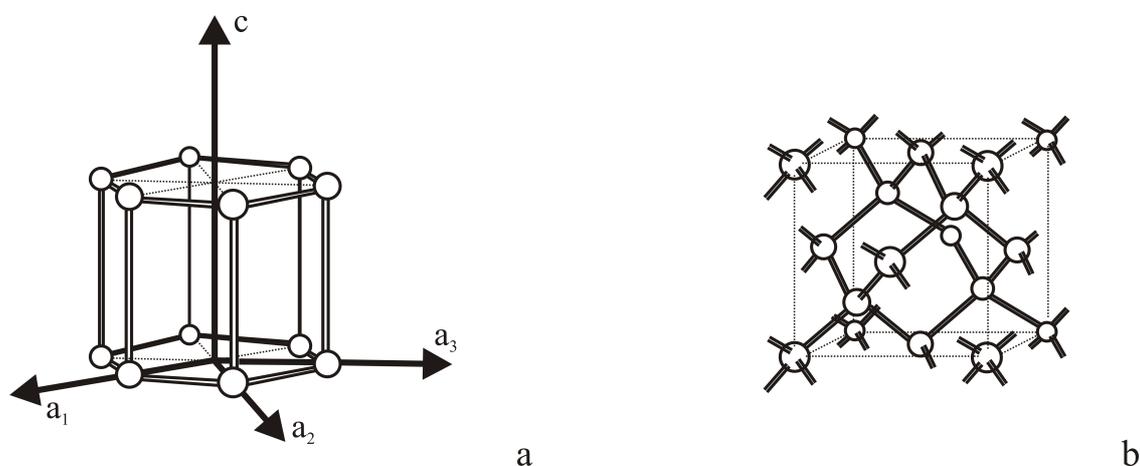
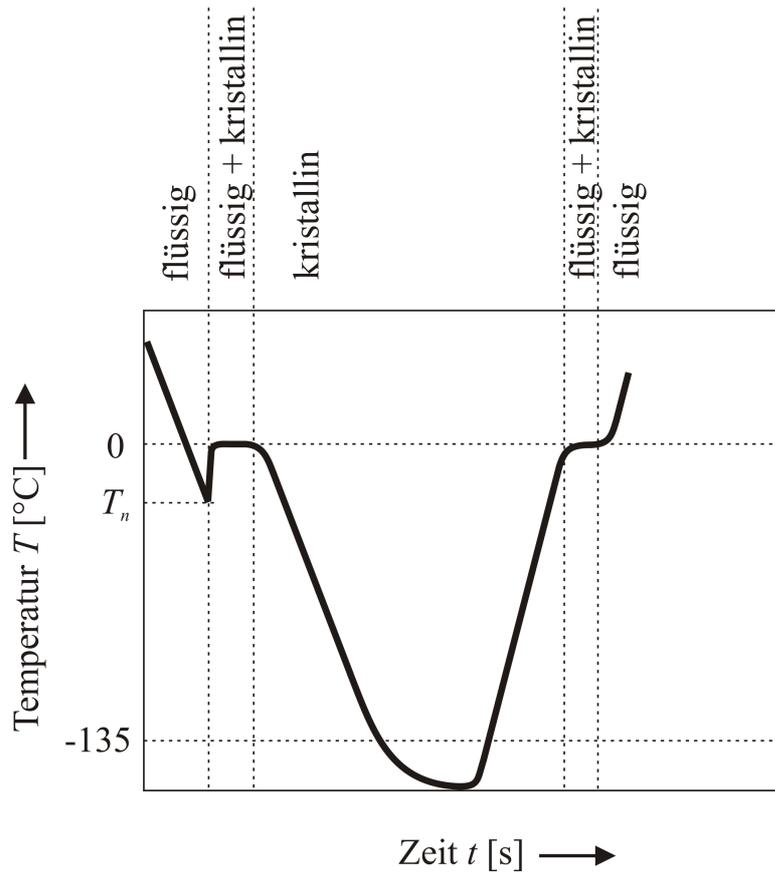
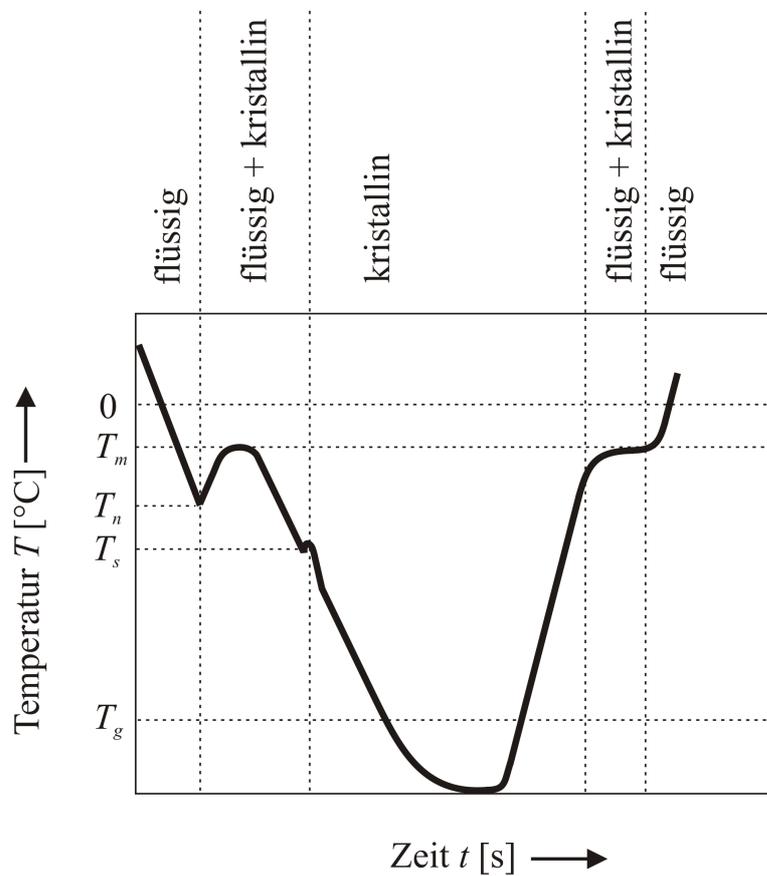


Abb. 3.4: Die Kristallstruktur von hexagonalem Eis (a) und von kubischem Eis (b) – dargestellt sind die Positionen der Sauerstoffatome [51].



a



b

Abb. 3.5:

Temperaturverläufe beim Gefrieren und Tauen von Wasser (a) und einer wässrigen Lösung mit gegebener Anfangskonzentration von 0,9 Gew.-% NaCl (b), [51], [217].

Nach der Nukleation bei der Nukleationstemperatur T_n steigt die Temperatur, abhängig von dem Grad der Unterkühlung, bis maximal zur Schmelztemperatur T_m an. Beim Gefrieren von reinem Wasser bleibt die Temperatur zunächst konstant bei T_m , da die produzierte Latentwärme genauso groß wie die abgeführte Wärme ist. In wässrigen Lösungen hingegen sinkt die Temperatur auf den aktuellen, fallenden Schmelzpunkt der sich aufkonzentrierenden Schmelze. Sobald die Produktion an Latentwärme geringer ist als deren Abführung, sinkt die Temperatur stärker. Unterhalb der Solidustemperatur T_s erstarrt die Schmelze, was zu einem weiteren Temperaturanstieg führen kann [217].

Augrund der Destabilisierung der planaren Eiskristallfront entstehen gekerbte, zungenförmige, verstreute (dendritische) und doppelt verstreute Morphologien der Eiskristallfront [78], [174]. Dieses nicht-planare Eis hat gegenüber planarem Eis eine höhere Oberflächenspannung γ_{sl} und hat damit einen tieferen Schmelzpunkt. Nicht-planares Eis, welches sich in einer Zellmembran-Pore mit dem Radius a befindet und mit dieser im Kontaktwinkel θ steht, erfährt eine Gefrierpunktserniedrigung ΔT , die mit Hilfe der Kelvin-Gleichung berechnet werden kann zu

$$\Delta T = \frac{2 \cdot v_c \cdot T^0 \cdot \gamma_{sl} \cdot \cos(\theta)}{a \cdot \Delta H_f} \quad (3.22)$$

wobei v_c die molare Masse von Eis, T^0 die Schmelztemperatur von planarem Eis und ΔH_f die Latentwärme von Wasser ist [4].

3.1.2 Phasendiagramme

Zur Beschreibung der Zustände von Stoffsystemen werden Phasendiagramme genutzt. Sie gelten grundsätzlich nur im thermodynamischen Gleichgewicht. Im Bereich der Kryokonservierung basieren Phasendiagramme entweder auf morphologischen Studien der Eiskristall-Struktur oder thermischen Analysen der Phasenübergangs-Temperaturen [71]. Obwohl kürzlich das erste quaternäre Phasendiagramm veröffentlicht wurde [73], soll hier das für diese Arbeit relevante ternäre Phasendiagramm H_2O - NaCl - Me_2SO näher beschrieben werden (Abb. 3.6). Wird eine wasserreiche Lösung bestehend aus den Stoffkomponenten H_2O , NaCl und Me_2SO langsam abgekühlt, so bildet sich bei der Temperatur T' beim Erreichen der Liquidusfläche Eis aus. Die aktuelle Zusammensetzung des Stoffsystems entspricht dabei der Projektion der aktuellen Temperatur auf die Grundfläche des Phasen-

diagramms. Während sich die Temperatur von T' nach T'' entlang der Liquidusfläche ändert, konzentriert sich die Lösung auf (I nach II). Dabei verringert sich die Konzentration an H_2O C_{H_2O} und der R -Wert bleibt konstant, mit

$$R = \frac{C_{Add}}{C_{NaCl}} \quad (3.23)$$

wobei C_{Add} und C_{NaCl} die Konzentrationen des Additivs und des NaCl in der Schmelze sind.

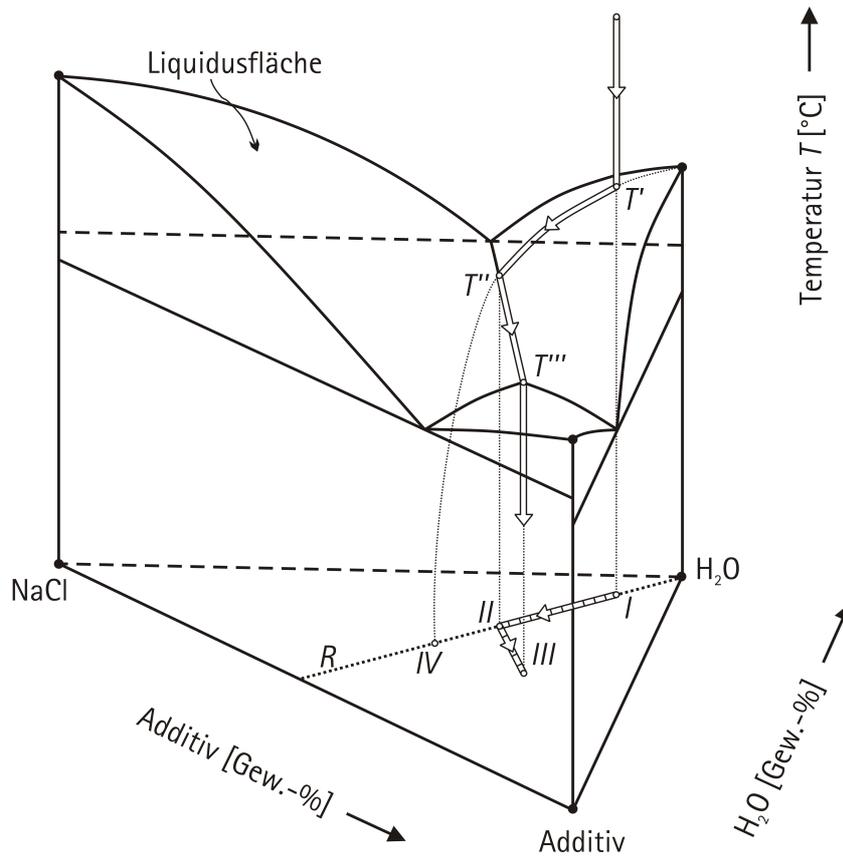


Abb. 3.6: Qualitative Darstellung eines ternären Phasendiagramms mit H_2O -NaCl-Additiv. Ebenfalls ist eine Grundfläche enthalten, die die jeweiligen Massenanteile der Stoffkomponenten veranschaulicht [146].

Beim weiteren Abkühlen von T'' nach T''' entlang des eutektischen Grabens verschiebt sich der R -Wert (II nach III). Im ternären eutektischen Punkt (III) bei der Temperatur T''' verfestigen sich alle Komponenten. Mit den Indizes der festen Phase s , der flüssigen Phase l und allen Phasen des Systems 0 und der verallgemeinerten Hebelregel können die Massenanteile f der Stoffkomponenten bestimmt werden, mit:

$$f_l = \frac{C_{Add,s} - C_{Add,0}}{C_{NaCl,s} - C_{Add,l}} = \frac{C_{NaCl,s} - C_{NaCl,0}}{C_{NaCl,s} - C_{NaCl,l}} = \frac{C_{H_2O,s} - C_{H_2O,0}}{C_{H_2O,s} - C_{H_2O,l}} \quad (3.24)$$

$$f_s = 1 - f_l \quad (3.25)$$

Mithilfe des Phasendiagramms aus Abb. 3.6 und der Konzentrationsverteilung an Elektrolyten in der gefrierenden Lösung kann die lokale Unterkühlung bestimmt werden.

Wächst eine Eiskristallfront mit der Geschwindigkeit v in einer wässrigen Lösung, so erhöht sich die lokale Konzentration an Elektrolyten $C_l(x)$ vor der Eiskristallfront (Abb. 3.7, oben links). Dadurch kann sich die entsprechende lokale Liquidustemperatur $T_l(x)$ oberhalb der Probertemperatur $T(x,t)$ verschieben, sodass eine konstitutionelle Unterkühlung auftritt. Wird eine ursprünglich planare Eiskristallfront destabilisiert, so wächst der Eiskristall vornehmlich in Bereiche, in der konstitutionelle Unterkühlung herrscht und die Eiskristallfront wird nicht-planar.

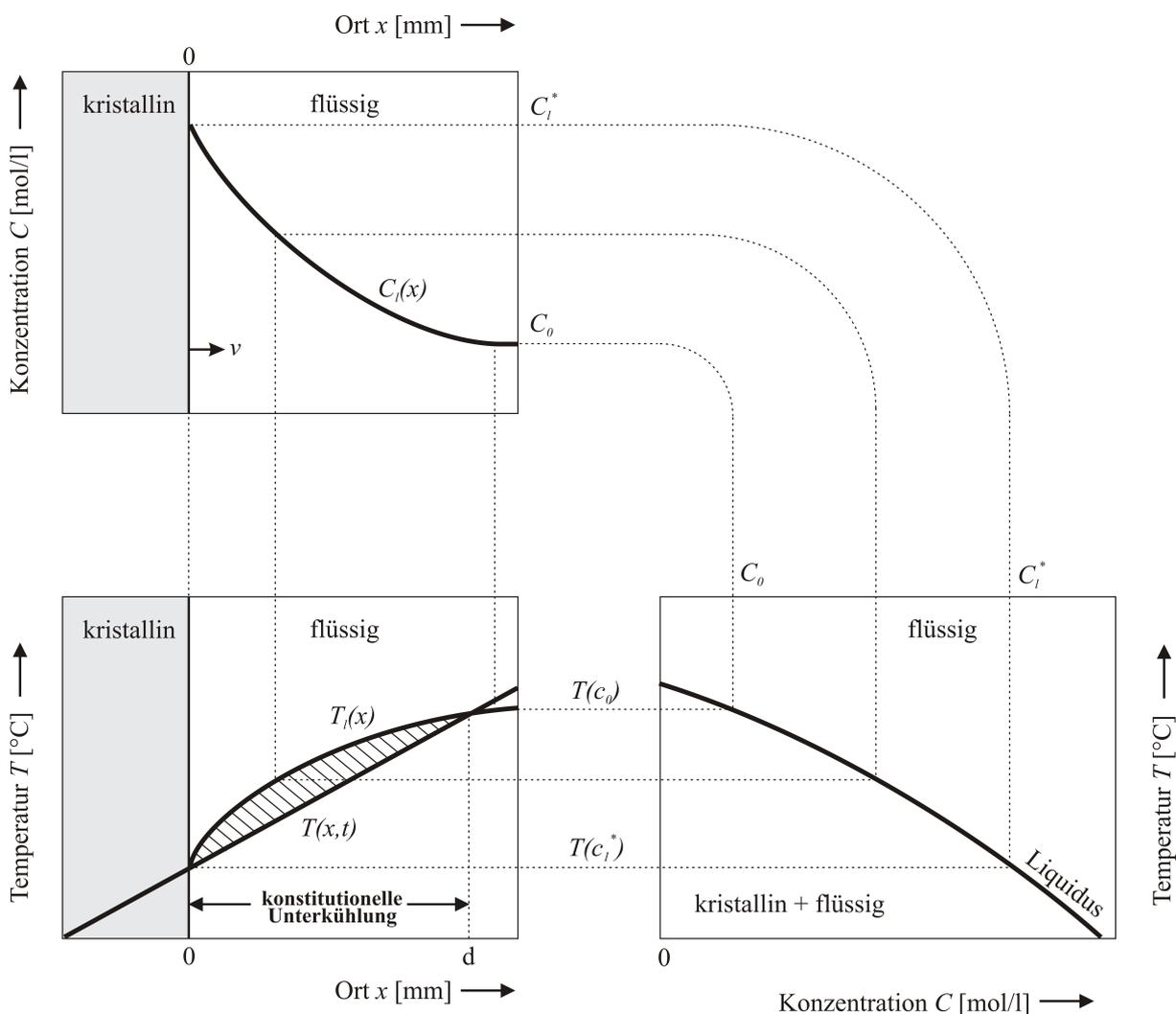


Abb. 3.7: Erläuterung der konstitutionellen Unterkühlung: Aufgrund der ortsabhängigen Konzentration der Lösung $C_l(x)$ vor der Phasenfront (oben links) ergeben sich entsprechend der Liquiduskurve (unten rechts) ortsabhängige Liquidustemperaturen. Im Diagramm (unten links) ist im Bereich $0 < x < d$, die lokale, zeitabhängige Temperatur $T(x,t)$ kleiner als die Liquidustemperatur $T_l(x)$ und die Lösung ist dort konstitutionell unterkühlt [112].

3.1.3 Eigenschaften von Frierschutzmitteln

In der Regel werden in der Kryokonservierung zur Minimierung der prozessbedingten Schäden des biologischen Materials Frierschutzmittel (engl.: cryoprotective agents, CPA) eingesetzt. Es existieren nur wenige Ausnahmen, bei denen hohe Kühlraten genutzt wurden und dabei auf Frierschutzmittel verzichtet werden konnte [86], [144]. Bisweilen wurden eine Vielzahl von Chemikalien als Frierschutzmittel identifiziert, die ihre schützenden Effekte in unterschiedlichen biologischen Materialien bewiesen haben. Tab. 3.1 zeigt eine Zusammenstellung gängiger Frierschutzmittel. Daraus ist ersichtlich, dass diese Frierschutzmittel keiner einheitlichen Stoffgruppe zugeordnet sind, sondern nach ihren chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften kategorisiert werden können. Zu diesen für die Kryokonservierung bedeutsamen Eigenschaften von Frierschutzmitteln zählen:

- Schmelzpunkt-Erniedrigung
- Interaktion mit Eis
- Stabilisierung von Proteinen
- Toxizität
- Löslichkeit
- Permeabilität
- Viskosität

Frierschutzmittel ändern die physikalischen Eigenschaften einer wässrigen Lösung. Dies gilt im besonderen Maße für niedermolekulare Frierschutzmittel wie Dimethylsulfoxid, Ethylenglycol und Glycerin. Sie verringern die Konzentration an Wasser durch die Anzahl ihrer Moleküle. Dadurch ändern sich die kolligativen Eigenschaften der Lösung, darunter ihre Schmelztemperatur, Dampfdruck und ihr osmotischer Druck [117]. Die Schmelztemperatur T_m einer Lösung erniedrigt sich um $1,855^\circ\text{C}$ für jede osmolale Erhöhung an Frierschutzmittel. Zusätzlich ist mit einer Schmelztemperatur-Erniedrigung ΔT_m auch eine homogene Nukleationstemperatur-Erniedrigung ΔT_h , verbunden. Den Zusammenhang liefert der Parameter $\lambda = \Delta T_h / \Delta T_m$. Dieser wird genutzt, um Lösungen von Frierschutzmitteln zu vergleichen und nimmt Werte im Bereich von 1,5 bis 5 an [62]. Der Schutzmechanismus von Frierschutzmitteln auf biologisches Material aufgrund einer Schmelztemperatur-Erniedrigung lässt sich folgendermaßen beschreiben: Eine Schmelztemperatur-Erniedrigung führt nach der Eiskristallbildung bei gegebener Temperatur dazu, dass der Anteil an Eis reduziert wird [128].

Mit anderen Worten ändert sich die Schmelze, bezogen auf die Zusammensetzung vor der Kristallisation, weniger. Außerdem verringert sich aufgrund der Präsenz der Frierschutzmittel die Salzkonzentration in der Schmelze [116].

Frierschutzmittel beeinflussen die mechanische Interaktion zwischen Eiskristallen und Zellen. Mit 2,7 M Glycerin eingefrorene Erythrozyten wurden vom Eis eingeschlossen und überlebten. In Abwesenheit von Glycerin wurden die Erythrozyten in die sich aufkonzentrierenden, interdendritischen Bereiche gedrückt und überlebten nicht [87]. Ähnliche Untersuchungen wurden mit Lymphoblasten durchgeführt, mit 100 M Trehalose wurden die Zellen von der wachsenden Eiskristallfront eingeschlossen und überlebten, während mit 10 M Trehalose die Zellen nicht eingeschlossen wurden und ihre Vitalität verloren [83].

Es wird vermutet, dass einige Frierschutzmittel wie Dimethylsulfoxid und Glycerin, Proteine stabilisieren können [66]. Nach dem „preferential exclusion“ Mechanismus werden Proteine dabei unter Minimierung der Gibbs-Energie bevorzugt in ihrem nativen Zustand gegenüber einem denaturierten Zustand gehalten, was zu einer Stabilisierung ihrer Konformation führt [14]. Interessanterweise wurden einige Chemikalien wie Harnstoff ebenfalls den Frierschuttmitteln zugeordnet, obwohl sie dem gegenteiligen Phänomen des „preferential binding“ Mechanismus unterliegen und vorzugsweise Proteine von ihrem nativen Zustand in den denaturierten Zustand überführen.

Tab. 3.1: Auflistung von Chemikalien mit kryoprotektiver Wirkung, erweitert nach Lippert et al. [121] und Baust et al. [20].

| | | | |
|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Acetamid | Erythritol | Mannitol | Serin |
| Agarose | Ethanol | Mannose | Natriumbromid |
| Alginat | Ethylenglycol | Methanol | Natriumchlorid |
| Alanin | Monomethylether | Methoxypropandiol | Natriumjodid |
| Albumin | Formamid | Methylacetamid | Natriumnitrat |
| Ammoniumacetat | Glucose | Methylformamid | Natrum-sulfat |
| Butanediol | Glycerin | Methylharnstoff | Sorbitol |
| Chondroitinsulfat | Glycerophosphat | Methylglucose | Sucrose |
| Chloroform | Glycerylmonoacetat | Methylglyzerin | Trehalose |
| Cholin | Glycin | Phenol | Triethylenglycol |
| Cyclohexandiol | Hydroxyectoin | Pluronicpolyol | Trimethylaminacetat |
| Dextran | Hydroxyethylstärke | Polyethylenglycol | Harnstoff |
| Diethylenglycol | Inositol | Polyvinylpyrrolidon | Valin |
| Dimethylacetamid | Lactose | Prolin | Xylose |
| Dimethylformamid | Magnesiumchlorid | Propylenglycol | |
| Dimethylsulfoxid | Magnesiumsulfat | Pyridin-N-Oxid | |
| Ectoin | Maltose | Ribose | |

Die Toxizität von Frierschutzmitteln ist besonders bei den niedermolekularen Frierschutzmitteln beobachtet worden. Mittels der $[K^+]/[Na^+]$ -Methode² wurden toxikologische Untersuchungen mit Me_2SO , Ethylenglycol und Glycerin an Gewebeschnitten bei 25°C durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass Me_2SO am wenigsten toxisch ist [37]. Unter Verwendung von Me_2SO , Glycerin und im besonderen Maße bei 1,2-Propanediol wurde in Maus-Embryonen spektroskopisch die Entstehung von Formaldehyd nachgewiesen, die als eine alternative Ursache für Zellschädigungen vorgeschlagen wurde [92]. Nach einer zehnminütigen Inkubation von 7,5 Vol.-% Me_2SO in Nierenzellen vom Rhesusaffen bei 25°C zeigte sich mittels der Rasterelektronenmikroskopie bereits eine Dilatation und eine Degranulation des rauen Endoplasmatischen Retikulums sowie evidente Schädigungen an den Mitochondrien [125]. Vergleichende Messungen an diesem Zelltyp bei 4°C unter gleichen Bedingungen ergaben keine sichtbaren Schädigungen, jedoch ein Anschwellen der Mitochondrien im Vergleich zur Kontrolle (ohne Me_2SO). Hochmolekulare Frierschutzmittel wie Hydroxyethylstärke wurden in der Kryokonservierung von Blut eingesetzt und mussten vor der Transfusion aufgrund der geringen Toxizität nicht ausgewaschen werden [187]. Da die Toxizität zeit- und temperaturabhängig ist, werden Frierschutzmittel dem biologischen Material bei 4°C oder bei hohen Konzentrationen und tieferen Temperaturen stufenweise hinzugegeben [24], [39], [192].

Bei der Suche nach neuen Frierschutzmitteln ist auch die Löslichkeit der meist niedermolekularen Frierschutzmitteln in Wasser von Bedeutung. In Studien an Me_2SO_2 (Dimethylsulfon), das dem Frierschutzmittel Me_2SO sehr ähnlich ist, wurde festgestellt, dass dieses bei tiefen Temperaturen aus der Lösung ausfällt und sich als Feststoff innerhalb von Zellen anlagern kann und dort zelltoxisch wirkt [128].

Die Permeabilität von Frierschutzmitteln bestimmt, wie schnell dieses in biologisches Material eindringt und sich dort verteilt. Die Triebkraft ist dabei ein Konzentrationsgradient, der sich hauptsächlich über Diffusion ausgleicht. Zusätzlich wirken bei dem Stofftransport elektrostatische Ladungen von Molekülen [177], Membraneigenschaften [29], [67] und die temperaturabhängige Viskosität [90] mit. Des Weiteren spielt die Molekülgröße der Frierschutzmittel eine Rolle, wobei niedermolekulare Frierschutzmittel sich schneller als hochmolekulare verteilen. Zur Erlangung einer möglichst homogenen Frierschutzmittel-Verteilung in den Proben müssen vor allem bei räumlich ausgedehnten Proben lange Einwirkzeiten genutzt werden. Bernemann et al. haben kürzlich die Equilibrierungs-Zeiten von 5% Me_2SO

² Bei dieser Methode wird das intrazelluläre Verhältnis der Konzentrationen $[K^+]/[Na^+]$ gemessen, um auf die Vitalität von Gewebeschnitten zu schließen [37].

in Kollagen-Scaffolds ($30 \times 30 \times 10 \text{ mm}^3$) mittels der Computertomographie untersucht. In dieser Studie erlangte der Scaffold erst nach 3 Stunden eine homogene Konzentrationverteilung und die Diffusionskonstante wurde experimentell zu $D = 0,24 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt [25]. Aus diesen Gründen muss der zeitliche Temperaturverlauf in der Kryokonservierung so gestaltet sein, dass beim Beladen und Entfernen von Frierschutzmitteln die Toxizität gering und die Permeabilität hoch ist.

3.2 Kryokonservierung von Zellen

3.2.1 Zell-Dehydrierung

Zellen können aufgrund der Semipermeabilität ihrer Plasmamembranen bei unterschiedlichen chemischen Potentialen der intra- und extrazellulären Lösungen ihr Volumen V verändern. In der Regel ist mit einer Zell-Volumenänderung hauptsächlich ein Flux von Wasser (Subskript: w) verbunden und es gilt dann für eine Zell-Volumenänderung dV/dt [137]

$$\frac{dV}{dt} = L_p \cdot A \cdot (\mu_w^i - \mu_w^e) / v_w = L_p \cdot A \cdot R \cdot T \cdot (M^e - M^i) \quad (3.26)$$

wobei L_p die hydraulische Konduktivität, A die Fläche der Zellmembran, v_w die molare Masse von Wasser, R die allgemeine Gaskonstante und M die Osmolalität ist (die Superskripte i und e beziehen sich auf den intra- und extrazellulären Raum). Die Rate, mit der Membranpermeierende Frierschutzmittel (Subskript: CPA) in die Zelle eindringen, ist durch die zeitliche Änderung ihrer Stoffmenge n_{CPA} gegeben:

$$\frac{dn_{CPA}}{dt} = P_{CPA} \cdot A \cdot (m_{CPA}^e - m_{CPA}^i) \quad (3.27)$$

P_{CPA} ist hierbei der Permeabilitäts-Koeffizient des gelösten Frierschutzmittels und m_{CPA} ist dessen Molalität. Die Verwendung eines Reflektions-Koeffizienten σ , der die Interaktion zwischen dem Wassertransport und einem Frierschutzmittel-Transport über der Zellmembran beschreibt, ist nach neueren Erkenntnissen nicht nötig [100], [137]. Einige Forscher nutzen jedoch ein erweitertes Modell, um die zeitliche Zell-Volumenänderung zu beschreiben [42], [91]:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{L_p \cdot A \cdot R \cdot T}{v_w} \left[\frac{\Delta H_f}{R} \left(\frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right) - \ln \left(\frac{V_{cv} - (n_s v_s + n_{CPA} v_{CPA})}{V_{cv} - (n_s v_s + n_{CPA} v_{CPA}) + v_w (\psi_s n_s + n_{CPA})} \right) \right] \quad (3.28)$$

Dieses Modell berücksichtigt den Wassertransport über der Zellmembran, die Eis-Nukleation und das Eiskristall-Wachstum. v ist das molare Volumen und n die Stoffmenge mit den Indizes w, s und CPA für Wasser, Salz und Frierschutzmittel. Für NaCl wird die Dissoziationskonstante $\psi_s = 2$ benutzt. Das Zell-Volumen besteht dabei aus der Summe des osmotisch inaktiven Volumens V_b und dem osmotisch aktiven Volumen V_{cv} . Wie in Abschnitt 3.1.2 mittels Phasendiagrammen erläutert, ändert sich in Anwesenheit von Eis bei Änderung der Temperatur die Konzentration an Elektrolyten bzw. an Frierschutzmittel, was zu einer Änderung der chemischen Potentiale führt. Aus diesem Grund schrumpft bzw. schwillt die Zelle während des Einfrierens und Auftauens, bis sich die chemischen Potentiale vom intra- und extrazellulärem Raum angeglichen haben ($\mu^i = \mu^e$).

Der Wassertransport über der Plasmamembran ist temperaturabhängig. Der Zusammenhang zwischen der hydraulischen Membran-Konduktivität (oder hydraulische Membran-Permeabilität) und der Temperatur wird durch eine Arrhenius-Beziehung beschrieben [10]:

$$L_p = L_{pg} \cdot \exp \left(- \frac{E_{Lp}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right) \quad (3.29)$$

Dabei ist L_{pg} eine Referenz-Membran-Konduktivität bei der Referenztemperatur T_R und E_{Lp} die Aktivierungsenergie. L_p und E_{Lp} sind die Membran-Parameter und beschreiben das osmotische Verhalten von Zell-Membranen. Sie sind abhängig vom Zelltyp und unterliegen außerdem einer starken Variation innerhalb einer Zellpopulation [161]. Frühere Messungen zur Bestimmung der Membran-Parametern wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und auf tiefere Temperaturen extrapoliert. Neuere experimentelle Methoden haben gezeigt, dass die Membran-Parameter unterhalb des Gefrierpunktes von denen oberhalb stark abweichen können und eine Extrapolation zu Fehlern von 5% führen kann, was zu einer Ungenauigkeit in den Simulationen führt [102]. In Abwesenheit von Eis führt eine Temperatur-Änderung nur zu einer thermotropen Änderung der Membran. In Anwesenheit von Eis kommt zusätzlich noch eine lyotrophe Membran-Änderung hinzu: Zellmembranen erfahren eine Dehydratation, was zu einer Phasenumwandlung ihrer Phospholipide vom flüssigen in einen gel-förmigen Zustand führt [208].

Es wird allgemein angenommen, dass ein extremes Dehydrieren von Zellen während der Kryokonservierung zu Zellschädigungen führt. Vorreiter hierfür ist die „minimum volume“-Hypothese, die beschreibt, dass nicht-permeierende Substanzen wie Salze zu einem

(undefinierbaren) Zusammenbruch der Membran-Integrität führen [138]. Unter dem Begriff „solution effects“ werden Zellschädigungen zusammengefasst, die aufgrund der Aufkonzentration von Elektrolyten bei extremer Zell-Dehydrierung auftreten [66]. Der Vollständigkeit halber soll hier auch erwähnt werden, dass nach der „unfrozen fraction“-Hypothese die „solution effects“ beim langsamen Einfrieren eine untergeordnete Rolle spielen. Demnach entstehen Zellschädigungen beim langsamen Einfrieren aufgrund der Verringerung der Größe der flüssigen Kanäle zwischen den Eiskristallen [134], [151]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass das „Zell-Volumen während des Einfrierens unabhängig von der NaCl-Tonizität in der Lösung ist“ [136]. Mit anderen Worten hängt das Zell-Volumen beim langsamen Einfrieren hauptsächlich von der Temperatur ab (vgl. Abschnitt 3.1.2).

3.2.2 Intrazelluläre Eiskristallbildung

Ein zentrales Dogma der Kryokonservierung ist, dass das Wachsen von intrazellulärem Eis (engl.: intracellular ice formation, IIF) irreversible Zellschädigungen hervorruft [96]. Intrazelluläres Eis per se scheint jedoch nicht schädigend zu wirken. Einen Einfluss hat hierbei die Größe der Eiskristalle, der intrazelluläre Ort und der Mechanismus des Eiskristallwachstums [66]. Der maximal von Zellen tolerierbare intrazelluläre Eis-Anteil wurde nach theoretischen Berechnungen bei kultivierten Hepatozyten zu 3,7% bestimmt [90]. Allgemein liegt dieser tolerierbare Eis-Anteil unterhalb von 15%. Es wird angenommen, dass Zellen überleben, die entweder ganz oder teilweise intrazellulär vitrifizieren [111]. Die kritische Größe, ab welcher Eiskristalle zellschädigend wirken, wurde zu 50 nm angegeben [179]. Es existieren verschiedene Hypothesen, die die Interaktionen von Eiskristallen mit Membranporen berücksichtigen. Eine mögliche Erklärung ist, dass Eiskristalle schon oberhalb einer Größe von 0,3 bis 0,8 nm zellschädigend wirken, und es in dem Augenblick zu einer Membran-Schädigung kommt, wenn die Krümmung eines wachsenden Eiskristalls innerhalb einer Membranpore deren Durchmesser übersteigt [131]. Verlieren intrazelluläre Membranen aufgrund solcher Mechanismen ihre Integrität, so können im Fall von Lysosomen schädigende, hydrolytische Enzyme in dem Zytoplasma freigesetzt werden [84]. Nach einer alternativen Hypothese deformiert extrazelluläres Eis die Plasmamembran. Als Folge könnten sich vorhandene Membranporen vergrößern und das Wachsen von extrazellulären Eiskristallen durch Poren in den Intrazellularraum begünstigen [69]. Einer weiteren Hypothese nach könnte extrazelluläres Eis auch die Plasmamembran extrazellulär so

beeinflussen, dass diese selbst intrazellulär eine Nukleation induziert [197]. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass sich unter bestimmten Bedingungen intrazelluläres Eis bilden kann: Wenn eine Zelle noch 10% ihres isotonischen Volumens besitzt, sich bei circa -33°C befindet und aufgrund der Kühlrate eine Unterkühlung von 2 K erfährt [66], [133]. Zur Zeit existieren einige wenige veröffentlichte Untersuchungen, in denen nachgewiesen wurde, dass intrazelluläres Eis sogar zellschützend wirkt [5], [6], [44], [166], [218]. In konfluenten Monolayern wurde beobachtet, dass intrazelluläres Eis schützt, indem es das Dehydrieren während des langsamen Einfrierens beeinflusst [6]. Zusätzlich wurde in Monolayern von epithelialen Nierenzellen und Fibroblasten beobachtet, dass intrazelluläres Eis, das über Gap-Junctions mit einem Durchmesser von $\sim 25 \text{ \AA}$ über das Protein Connexin-43 zwischen benachbarte Zellen wächst, die Membran-Integrität dieser Zellen schützt [4]. Die jeweiligen Zellen, von denen aus der Nukleations-Vorgang startete, überlebten nicht, während die benachbarten Zellen, welche durch Gap-Junctions nukleiert wurden, überlebten [40]. Neuere Untersuchungen an Monolayern dentaler Pulpa-Stammzellen, die über Gap-Junctions nukleiert wurden, behielten ihre Membran-Integrität, verloren jedoch ihre Fähigkeit zur Proliferation [218].

Es existieren verschiedene Hypothesen, die erklären können, wie intrazelluläres Eis entsteht [91], [197], [216]. Basierend auf der klassischen Nukleationstheorie wurden Modelle entwickelt, die das kumulative Verhalten von Zellen während des Einfrierens beschreiben können: Das SCN-Modell beschreibt eine intrazelluläre Nukleation, die durch die Zelloberfläche katalysiert wird (surface-catalyzed nucleation, SCN), wogegen das VCN-Modell eine intrazelluläre Nukleation beschreibt, welche durch intrazelluläre Nukleatoren katalysiert wird (volume-catalyzed nucleation, VCN) [16], [197]. Im SCN-Modell wird die Nukleationsrate I^{SCN} durch

$$I^{SCN} = \Omega^{SCN} \cdot \exp\left(\frac{-\kappa^{SCN}}{\Delta T^2 \cdot T^3}\right) \quad (3.30)$$

beschrieben, mit dem kinetischen Parameter Ω^{SCN} und dem thermodynamischen Parameter κ^{SCN} :

$$\Omega^{SCN} = \Omega_0^{SCN} \cdot \left(\frac{T}{T_{m0}}\right) \cdot \left(\frac{\eta}{\eta_0}\right) \cdot \left(\frac{A}{A_0}\right) \quad (3.31)$$

$$\kappa^{SCN} = \kappa_0^{SCN} \cdot \left(\frac{T_m}{T_{m0}}\right)^4 \quad (3.32)$$

Hierin ist A die effektive Zelloberfläche, T_m die Gleichgewichtsfriertemperatur und η die Viskosität. Das Subskript 0 bezieht sich auf isotonische Bedingungen. Mit Hilfe der Nukleationsrate I^{SCN} kann die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung PIF im SCN-Modell bestimmt werden mit:

$$PIF^{SCN} = 1 - \exp\left[-\frac{1}{B} \cdot \int_{T_n}^T A \cdot I^{SCN} \cdot dT\right] \quad (3.33)$$

B ist hierbei die Kühlrate und T_n ist die Nukleationstemperatur. Im VCN-Modell sind kinetische und thermodynamische Parameter zusätzlich vom Kontaktwinkel θ und dem Radius r^* des kritischen Clusters und Nukleators abhängig. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Plasmamembran in Anwesenheit von extrazellulärem Eis als Nukleator wirken kann und dann SCN verglichen mit VCN effizienter ist [197].

Die am häufigsten genutzte Methode zur Untersuchung der intrazellulären Eiskristallbildung ist die Kryomikroskopie [46]. Im Hellfeld-Durchlichtverfahren verdunkelt sich die Zelle nach einer intrazellulären Eiskristallbildung (engl.: „darkening“), was allgemein auf eine Mie-Streuung an einer großen Anzahl von Eiskristallen im Nanometer-Bereich zurückgeführt wird. Unter speziellen Bedingungen soll auch eine intrazelluläre Eiskristallbildung ohne Verdunkelung und ohne Phasenfront (engl.: „twitching“) beobachtet worden sein [175]. Andere Forschergruppen konnten ein „twitching“ bisher nicht reproduzieren [189], [7]. Mit Hilfe von Hochgeschwindigkeitskameras in Verbindung mit der Kryomikroskopie wurde kürzlich an adhärenenten, bovinen Endothelzellen in den parazellulären Kompartimenten dendritische Eiskristalle nachgewiesen, woraus geschlussfolgert wurde, dass das „darkening“ ein sekundärer Effekt ist [191]. Zur Untersuchung der intrazellulären Eiskristallbildung wurden darüber hinaus hochsensitive, kalorimetrische Methoden eingesetzt, die den Wärmefluss aufgrund der intrazellulären Phasenänderung detektieren können [101].

3.2.3 Zellvitalität nach der Kryokonservierung

Bei dem Prozess der Kryokonservierung von kultivierten Zellen werden unter Verwendung von Frierschutzmitteln üblicherweise die Verfahrensschritte Ernte, CPA-Beladung, Gefriervorgang, CPA-Entfernung und Qualitätstest durchlaufen (vgl. [Abb. 3.8](#)).

Ausgehend von einer in Zellkultur vorhandenen Zellzahl N_{total} mit einem Anteil an vitalen Zellen N_{vital} , können sich diese Zellzahlen bei jedem Verfahrensschritt aufgrund verschiedener

Zellschädigungen verringern. In der Zellvorbereitung kann vor allem das Ablösen der adhären, konfluenten Zellen durch Trypsinierung oder mechanischen Abschabens zellschädigend wirken. Während der Kryokonservierung kann es bereits im nicht gefrorenen Zustand zu zeitabhängigen zellulären Kälteschäden (engl.: chilling injuries, cold shock) kommen. Dazu zählen eine Destabilisierung des Zytoskeletts aufgrund einer Depolymerisation von Mikrotubuli um 4°C und Membranveränderungen durch Lipid-Phasenumwandlungen in unterschiedlichen Temperaturbereichen [49], [193]. Durch die Verfahrensschritte Beladen und Entfernen von Frierschutzmitteln kann ein osmotischer Schock verursacht werden. Vor allem während des Frier-Tau-Vorgangs (engl.: freeze-thawing procedure) können weitere Zellschädigungen durch die extrazelluläre Eiskristallbildung und deren Folgeeffekte entstehen (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Nach dem Tau-Vorgang muss während der Ermittlung der Qualität in Zellvitalitätstests der mögliche toxische und osmotische Einfluss von Färbemitteln sowie die Zell-Apoptose berücksichtigt werden.

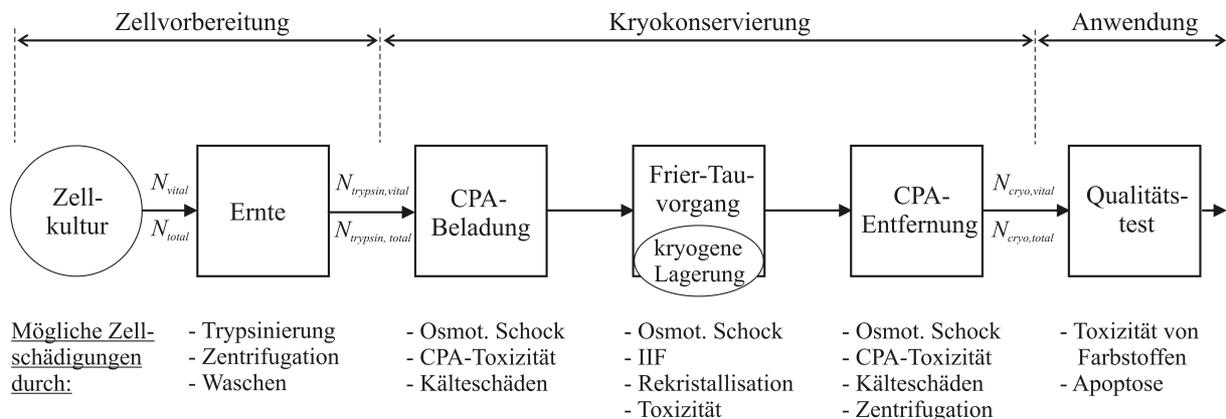


Abb. 3.8: Übliche Verfahrensschritte bei der Zellvorbereitung, Kryokonservierung und Anwendung von kultivierten Zellen und mögliche Ursachen von Zellschädigungen: Durch jeden Verfahrensschritt kann eine aus der Zellkultur gegebene Anzahl an vitalen Zellen N_{vital} und totalen Zellen N_{total} verringert werden. Es ergeben sich daraus unterschiedliche Definitionen der Überlebensraten. Eine maximale Überlebensrate kann nur erzielt werden, wenn alle Zellschädigungen minimiert werden. Die kryogene Lagerung von Zellen geschieht in der Regel bei Temperaturen unterhalb der Glasübergangstemperatur von Wasser, das bedeutet, unterhalb von -135°C.

Aus Abb. 3.8 ergeben sich die Definitionen von der absoluten Überlebensrate S_{abs} , relativen Überlebensrate S_{rel} , korrigierter Überlebensrate S_{corr} und der Wiederfindungsrate R nach [148] zu

$$S_{abs} = \frac{N_{cryo,vital}}{N_{total}} \cdot 100\% \quad (3.34)$$

$$S_{rel} = \frac{N_{cryo,vital}}{N_{cryo,total}} \cdot 100\% \quad (3.35)$$

$$S_{corr} = \frac{N_{cryo,vital}}{\left(\frac{N_{trypsin,vital}}{N_{trypsin,total}} \right) \cdot N_{total}} \cdot 100\% \quad (3.36)$$

$$R = \frac{N_{cryo,total}}{N_{total}} \cdot 100\% \quad (3.37)$$

mit der Anzahl N der vitalen plus nicht-vitalen Zellen (Index: total), der vitalen Zellen (Index: vital), der trypsinieren Zellen (Index: trypsin) und der kryokonservierten Zellen (Index: cryo).

Bei einem sinnvollen Vergleich von Zellvitalitäten muss bekannt sein, welche Definition die Angaben von den Überlebensraten zu Grunde liegen. Trotz dieser Vielzahl an Möglichkeiten der Zellschädigungen können viele Zellen in Suspension reproduzierbar mit hohen Überlebensraten kryokonserviert werden [24], [149]. Eine Übersicht von Überlebensraten von verschiedenen, kryokonservierten Zelltypen ist im Anhang, Tab. 10.1 zusammengestellt.

Bei der Kryokonservierung von Zellen können hohe Überlebensraten nur erreicht werden, wenn die genutzten Prozessparameter optimal eingestellt sind, sodass Zellschädigungen gering gehalten oder vermieden werden. Zu den Prozessparametern gehören:

- Kühl- und Heizrate
- Probengeometrie
- Nukleationstemperatur
- Konzentration an Frierschutzmitteln

Im Allgemeinen ist die Überlebensrate von der Kühlrate abhängig und der Zusammenhang wird häufig in einer invertierten U-förmigen Kurve dargestellt [132], [135]. Werden Zellen nach der extrazellulären Eiskristallbildung mit niedriger Kühlrate gekühlt, so wird die Überlebensrate durch Zellschädigung aufgrund von Lösungseffekten verringert, während die

Überlebensrate bei höheren Kühlraten durch schädigende intrazelluläre Eiskristallbildung herabgesetzt wird (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) [132]. Es existiert ein optimaler Kühlratenbereich mit maximaler Überlebensrate, in dem die optimale Kühlrate B_{opt} nach Thirumala et al. [196] durch

$$B_{opt} = 1009,5 \cdot \exp\{-0,0546 \cdot E_{Lp}\} \cdot L_{pg} \cdot \frac{A_c}{V_0 - V_b} \quad (3.38)$$

bestimmt werden kann. Die optimale Kühlrate unterscheidet sich jedoch bei unterschiedlichen Zelltypen. Generell liegt B_{opt} bei Zellen mit hoher hydraulischer Konduktivität L_p höher. Es existieren jedoch auch einige Zelltypen, deren Überlebensrate eine andere Abhängigkeit von der Kühlrate aufweisen. Bei den Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida utilis* sowie bei der humanen Zelllinie K562 ist der Kurvenverlauf im Vergleich zu den invertierten U-förmigen Kurve bei hohen oder niedrigen Kühlraten verändert [50]. Die [Gl. 3.38](#) beschreibt B_{opt} für den Fall einer konstanten einstufigen Kühlrate. Ebenfalls wurden zweistufige Kühlraten als vorteilhaft beschrieben [24]. Durch Simulation mit der Bedingung einer gegebenen maximalen Unterkühlung wurden optimale Kühlraten-Verläufe bestimmt und es wurde gezeigt, dass diese nicht-linear sind [207].

Die Überlebensrate hängt ebenfalls von der Heizrate ab. Experimentelle Untersuchungen an Maus-Oozyten zeigen, dass die Heizrate gegenüber der Kühlrate eine dominierende Rolle spielen kann [176]. Wenn sich während des Kühlvorganges intrazelluläre Eiskristalle gebildet haben, kann es zur sogenannten Rekrystallisation kommen. Hierbei fusionieren zahlreiche kleine Eiskristalle zu wenigen großen Eiskristallen und können so eine zellschädigende Größe erreichen. Darüber hinaus können vitrifizierte intrazelluläre Bereiche während der Erwärmung devitrifizieren, das bedeutet, durch Nukleation in den kristallinen Zustand überführt werden und während der weiteren Erwärmung rekrystallisieren. Hohe Heizraten können die schädigende Rekrystallisation kinetisch verhindern.

Die Probengeometrie ist ein weiterer Prozessparameter, der einen wesentlichen Einfluss auf die Überlebensrate hat. Flache Geometrien mit großem Oberfläche zu Volumenverhältnis gewährleisten einen besseren Wärmetransport und führen beim Gefrieren zu einer homogeneren Temperaturverteilung innerhalb der Probe. Im Gegensatz dazu kommt es beim Gefrieren von wässrigen Lösungen in zylinderförmigen Behältnissen bei gegebener äußerer Kühlrate zu unterschiedlichen Kühlraten innerhalb der Probe. Zunächst wird die Probe in den Randschichten gefrieren und durch Abgabe der Latentwärme innere Bereiche der Probe am Gefrieren hindern. Nach Abfuhr der Latentwärme gefrieren die inneren Bereiche schließlich schneller, da die Differenz zwischen innerer Probentemperatur und äußerer Temperatur

vergrößert ist [77]. Ebenfalls ist die geometrische Anordnung der Zellen in der Probe bedeutsam. Zellen, die innerhalb einer Zellsuspension dicht gepackt nebeneinander am Gefäßboden sedimentiert liegen, werden bei der Kryokonservierung eher geschädigt, als vereinzelte Zellen in der Suspension [189]. An Hamster-Fibroblasten wurde gezeigt, dass Zellen in Suspension, individuell adhärenente Zellen, Zellen in Kolonien und Zell-Sphäroide unterschiedliche Frierverhalten aufweisen [2]. Des Weiteren hängt die Vitalität kryokonservierter Zellen entscheidend von der Nukleationstemperatur ab. Abb. 3.9 zeigt den prinzipiellen Verlauf der Überlebensrate S über der Nukleationstemperatur T_n . Hierin existiert ein Optimum der Überlebensrate bei einer optimalen Nukleationstemperatur $T_{n,opt}$. Der Kurvenverlauf kann folgendermaßen beschrieben werden: Für $T_n < T_{n,opt}$ ist der Kurvenverlauf der Überlebensrate erniedrigt, da sich die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Nukleation und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer intrazellulären Eiskristallbildung bei tiefen

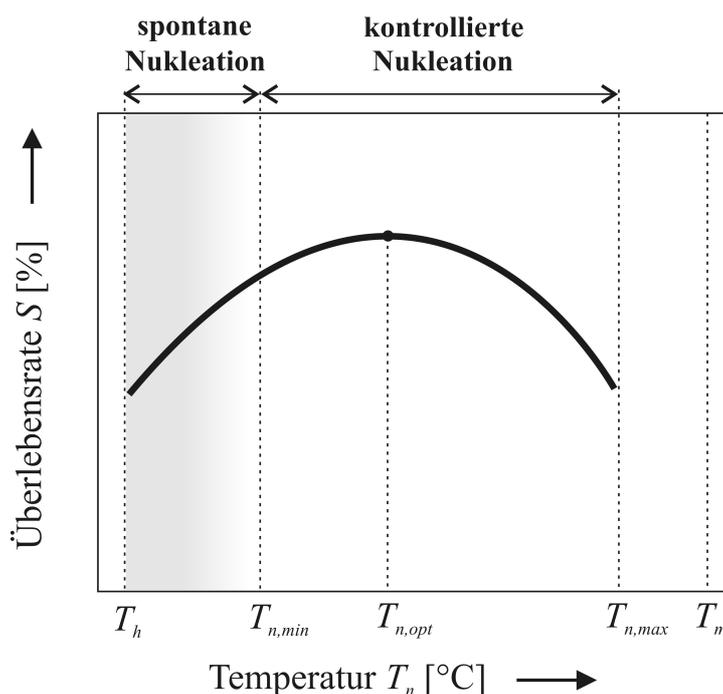


Abb. 3.9: Prinzipieller Kurvenverlauf der Überlebensrate von kryokonservierten Zellen in Abhängigkeit von der Nukleationstemperatur. Eine kontrollierte Nukleation ist im Temperaturbereich von $T_{n,min}$ bis $T_{n,max}$ möglich, während bei tieferen Temperaturen bis zur homogenen Nukleationstemperatur T_h eine spontane Nukleation immer wahrscheinlicher wird (grau hinterlegt). Im Kurvenverlauf existiert eine maximale Überlebensrate bei der optimalen Nukleationstemperatur $T_{n,opt}$. Im Temperaturbereich von $T_{n,max}$ bis T_m ist theoretisch eine Nukleation möglich, jedoch kann hier oftmals in der Praxis keine kontrollierte Nukleation ausgelöst werden [30],[157],[208].

Temperaturen erhöht. Für $T_n > T_{n,opt}$ wird der Abfall des Kurvenverlaufs durch zellschädigende Lösungseffekte (engl.: solution effects; vgl. Abschnitt 3.2.2) begründet [157], [208].

Die Zellvitalität ist im erheblichen Maße von den während der Verfahrensschritte (vgl. Abb. 3.8) eingesetzten Konzentrationen an Frierschutzmitteln c_{CPA} abhängig. In verschiedenen Parameterstudien wurden die Konzentrationen verschiedener Frierschutzmittel variiert, um die optimale Frierschutzmittelkonzentration $c_{CPA,opt}$ für eine maximale Zellvitalität zu ermitteln [24], [149]. Die Konzentration von Hydroxyethylstärke wurde an humanen Keratinozyten von 0 bis 10 Gew.-% variiert und die höchsten relativen Überlebensraten von 80% wurden bei 10 Gew.-% bestimmt [149]. Unter Variation der Konzentration an Dimethylsulfoxid wurde ebenfalls an humanen Keratinozyten eine optimale Konzentration von 2,5%³ Me₂SO bestimmt [24]. In Verbindung mit einer Kühlraten-Variation wurde in dieser Studie eruiert, dass die Konzentration an Frierschutzmittel bei optimaler Kühlrate B_{opt} vermindert werden kann, jedoch bei suboptimalen Kühlraten erhöht werden muss [24].

3.3 Stand der Forschung und Technik

3.3.1 Methoden zur theoretischen Beschreibung des Wärme- und Stofftransports

Verschiedene theoretische Methoden wurden entwickelt, um den Temperatur- und Konzentrationsverlauf innerhalb von gefrierenden Proben in Einstoffsystemen, in Mehrstoffsystemen sowie in biologischen Systemen zu quantifizieren. Tritt in diesen Systemen eine wandernde Phasenfront auf, so zählen diese mathematisch zu den Stefan-Problemen [34]. Viele Autoren berechneten vereinfachend hierzu den eindimensionalen Fall der Transportvorgänge, was aus Symmetriegründen bei bestimmten Probengeometrien erlaubt ist [209], [76], [34]. Jochem et al. [88] und Heschel et al. [76] formulierten eine Energie- und Stoffbilanz für ein plattenförmiges Friercontainer-System als Modell für die Kryokonservierung von Erythrozyten in Frierbeuteln. Mit Hilfe der Fourierschen Differenzialgleichung stellten sie die Energiebilanzgleichung für eine instationäre eindimensionale Wärmeleitung auf [76]:

³ Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, sind in dieser Arbeit die Prozentangaben der Frierschutzmittel in Vol.-% angegeben.

$$\rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho \cdot L \cdot \frac{\partial \cdot (c_{tot} / c_{liq}(T))}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \right) \quad (3.39)$$

Hierin sind ρ die Massendichte, c_p die spezifische Wärmekapazität, L die Latentwärme und λ die thermische Leitfähigkeit. Über die Konzentrationen des flüssigen und festen Anteils c_{tot} und die Konzentrationen des flüssigen Anteils c_{liq} ist Gleichung 3.39 mit der folgenden Stoffbilanzgleichung gekoppelt, die unter Nutzung des Fick'schen Gesetzes erstellt wurde [76]:

$$\frac{\partial c_{tot}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \cdot \frac{c_{tot}}{c_{liq}(T)} \cdot \frac{\partial c_{liq}(T)}{\partial x} \right) \quad (3.40)$$

Hierin ist D der Diffusionskoeffizient der Lösung. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Konzentrationen sind die Gleichungen 3.39 und 3.40 nichtlinear. Da nur wenige Spezialfälle von Stefan-Problemen analytisch lösbar sind, wurde zur Lösung ein numerischer Lösungsweg mit Hilfe eines Newton-Algorithmus genutzt. Mit dieser numerischen Methode berechneten die Autoren die Temperaturverläufe sowie die Lösungskonzentrationen an verschiedenen Orten der Proben innerhalb des Friercontainer-Systems während der Kryokonservierung [88], [76]. Im Gegensatz zu dieser eindimensionalen Betrachtung berechneten einige Forscher das Stefan Problem auch für den zweidimensionalen Fall [127], [200]. Hierbei wurde die Geometrie einer planaren oder einer nicht-planaren Phasenfront mitberücksichtigt. Udaykumar et al. nutzten die *sharp interface-Methode*, um dendritische Eis-Phasenfronten in Salzlösungen zu berechnen [200]. Sie fanden heraus, dass die Schmelze aus nicht gleichmäßig verteilten Komponenten besteht, was in bisherigen Untersuchungen, unter Nutzung von Phasendiagrammen, jedoch angenommen wurde [91], [197].

Um die Interaktion der Eis-Phasenfront mit Zellen zu verstehen, wurde die Methode der *Gerichteten Erstarrung* genutzt. Wollhöver et al. lösten das gekoppelte, transiente Wärme- und Stofftransport-Problem von Salzlösungen mit Hilfe der *Vichnewetsky-Methode* [202]. Sie fanden heraus, dass in Salzlösungen die thermische Diffusionslänge (10 mm) um den Faktor 100 größer ist als die stoffliche Diffusionslänge (0,1 mm). Sie konnten während der *Gerichteten Erstarrung* den Ort der Eis-Phasenfront, die Temperatur- und Konzentrationsverteilung im System sowie lokale Unterkühlungen der Schmelze während des Einfrierens mit unterschiedlichen Kühlraten bestimmen [209].

Körper et al. [106] und Lipp et al. [115] betrachteten ein Modell mit sphärischen Partikeln, die sich mit einer Geschwindigkeit v vor einer Eis-Phasenfront bewegten [115]. Zwischen der Phasenfront und dem Partikel befand sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, damit die Eis-

Phasenfront wachsen konnte. Aus der stationären Gleichgewichtsbedingung der dabei auftretenden Kräfte, einer an die Phasenfront andrückenden Stokes'schen Kraft und einer Van-der-Waals-Wechselwirkung, wurde die kritische Geschwindigkeit v_c bestimmt, bei der ein Partikel gerade nicht vom Eis eingeschlossen wird. Sie fanden heraus, dass die kritische Geschwindigkeit von der Viskosität der Suspension η , von dem Temperaturgradienten G sowie vom Radius des Partikels R abhängt, mit:

$$v_c = \eta^{-1/2} \cdot G^{1/4} \cdot R^{-1} \quad (3.41)$$

Die Interaktion der Phasenfront mit Zellen wurde von Mao et al. mit der *sharp interface*-Methode untersucht, um die Dynamik der Eis-Phasenfront zu simulieren [126]. Die Zellen wurden dabei vereinfachend als eine, mit einer semipermeablen Membran, umhüllten Salzlösung modelliert. Sie zeigten, dass Instabilitäten der Phasenfronten kaum Einfluss auf das Zellschrumpfen hatte, jedoch geringe Temperatur-Differenzen innerhalb der Probe zu signifikanten Änderungen des Zellschrumpfens führten.

3.3.2 Methoden zur Kontrolle der Nukleationstemperatur

Verschiedene physikalische Prinzipien wurden erfolgreich genutzt, um das Nukleieren (engl.: seeding) einer unterkühlten, wässrigen Probe bei einer definierten Nukleationstemperatur durchzuführen. Der Vollständigkeit halber soll hier zunächst erläutert werden, welche untersuchten physikalischen Prinzipien nicht zum Nukleieren genutzt werden können. Saito et al. folgerte aus Experimenten an unterkühltem Wasser, dass eine Konvektion, eine Vibration und eine Schockwelle keinen Effekt auf dessen Frierverhalten hat [173]. Pruppacher zeigte, dass ein mechanisches Bewegen von unterkühlten Wassertropfen auf einer Oberfläche diese nicht gefrieren ließ [164]. Ebenfalls hatten geringe statische elektrische Feldstärken im Bereich von $\sim 10^5$ V/m bei Wassertropfen keinen Einfluss auf deren Nukleationsverhalten [47], [178]. Kürzlich wurde von Olmo et al. berichtet, dass Ultraschall bei Frequenzen von 800 kHz und $0,15 \text{ W/cm}^2$ (ohne Kavitation) die Nukleation von $1,4 \mu\text{L}$ Wassertropfen nicht beeinflusst [147].

Dem gegenüber stehen eine Reihe physikalischer Prinzipien zur Verfügung, welche zum kontrollierten Nukleieren eingesetzt werden können. Ein physikalisches Prinzip ist die

Erzeugung einer lokalen Unterkühlung in der Probe. Morris et al. beschrieben hierzu zwei gängige Methoden bei der Kryokonservierung von Mäuse-Embryonen, humanen Spermien und embryonalen Stammzellen: Erstens, nach einer konventionellen Methode wurde ein mit Flüssigstickstoff gekühlter Metallstab an einer äußeren Oberfläche eines Probengefäßes geführt, der die Probe innerhalb des Probengefäßes nukleierte. Zweitens, es wurde ein Gas, welches unter hohem Druck entspannt wurde und sich dabei abkühlte, zur Erzeugung der Unterkühlung und Kontrolle der Nukleationstemperatur eingesetzt [140]. König et al. nutzen Peltier-Elemente zur Unterkühlung, um die Nukleationstemperatur von Urea-Hexadecan Lösungen zu kontrollieren, womit sie die Größen der in der Lösung wachsenden Kristalle einstellen konnten [104]. Holman et al. entwickelten ein auf Peltier-Elementen basierendes System für die Kryochirurgie, welches von Takeda et al. weiterentwickelt und simuliert wurde [79], [194]. Diese hier beschriebenen, auf Peltier-Elementen basierenden Systeme wurden bisher jedoch nicht in der Kryokonservierung von Zellen eingesetzt.

Auf einem anderen physikalischen Prinzip zur Kontrolle der Nukleationstemperatur basieren spezielle Kryoadditive, die Eis-Nukleatoren (engl.: ice nucleation agent, INA) genannt werden [214]. Thangaraj et al. schlugen vor, dass Eis-Nukleatoren bestimmte Nukleationsfördernde Bereiche (engl.: ice nucleation sites) aufweisen, deren Nukleations-Effizienz von mehreren Faktoren wie der Kristallgitteranpassung, Größe und Wasserlöslichkeit abhängt [195]. Zu den Eis-Nukleatoren zählen organische und anorganische Chemikalien wie Silberjodid, α -Phenazin, Phloroglucinol Dihydrat, Metaldehyd, Silikate von Ton und Glimmer, Phosphatidylinositol und langkettige Alkohole [129], [130], [139], [206]. Außerdem können einige Aminosäuren und einige mikrobielle Proteine Eis nukleieren, wie von den epiphytischen Bakterien *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*, *E. ananas*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, *Xanthomonas compestris* und rekombinanten *Escherichia coli* [12], [33], [130]. Wilson berichtete, dass die Nukleationstemperatur immer mit größerer molekularer Masse der Nukleatoren ansteigt, sodass im Fall von *Pseudomonas syringae* der Temperaturbereich von $T_n = -12^\circ\text{C}$ mit 150 kD bis $T_n = -2^\circ\text{C}$ mit 8000 kD kontrolliert werden kann [206]. Han et al. zeigten kürzlich, dass Nanopartikel ebenfalls als Eis-Nukleatoren eingesetzt werden können und diese vergleichsweise preisgünstig sind [72]. Thirumala et al. führten Gefrier-Experimente mit HeLa- und Jurkat-Zellen durch, welche zuvor mit Palmitoyl-Gold-Nanopartikeln inkubiert worden waren und fanden heraus, dass die Zellen nach dem Auftauen Apoptose begingen. Sie schlussfolgerten aus diesen Experimenten, dass diese Nanopartikel vor allem in der Kryochirurgie Anwendungen finden könnten [196].

Mit dem Prinzip des Electrofreezings kann die Wahrscheinlichkeit für eine Nukleation in einer wässrigen Probe durch Anlegen einer hohen elektrischen Feldstärke erhöht werden (vgl. Gleichung 3.11 und 3.12). Mit diesem Prinzip wurden Systeme entwickelt, die durch Anlegen einer Hochspannung die Nukleationstemperatur von Proben kontrollieren können. Rau führte die ersten systematischen Nukleations-Experimente mit elektrischen Feldstärken im Bereich von $\sim 10^6$ V/m an unterkühlten wässrigen Proben durch. Er nahm an, dass die dielektrische Polarisierung von Wasser für den Electrofreezing Effekt verantwortlich ist [168]. Braslavsky et al. entwickelten das erste indirekte Electrofreezing-System, mit dem wässrige Lösungen ohne den direkten Einfluss der Hochspannung nukleiert werden konnten [30]. Das Prinzip dieses Systems ist in Abb. 3.10 dargestellt. Es bestand aus einer 1 mm dünnen Glaskanüle, in der sich zur Auslösung der Nukleation zwei Hochspannungselektroden und zur Temperaturmessung ein Thermistor befanden. Zusätzlich war in dieser Glaskanüle ein Peltier-Element eingebaut, welches für wenige Sekunden eingeschaltet wurde, um das Wasser „um ein paar Grad unter der Umgebungstemperatur zu kühlen“, sodass das Electrofreezing effizient wurde [30].

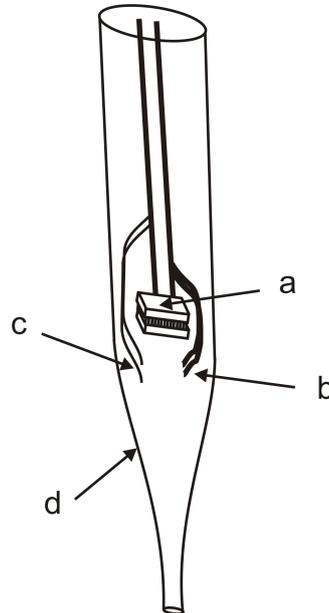


Abb. 3.10: Schematische Skizze des ersten indirekten Electrofreezing-Systems. Dieses besteht aus einem Peltier-Element (a), Hochspannungselektroden (b), Thermistor (c) und einer Glas-Kapillare (d), [30].

Petersen et al. entwickelten ein auf dem Prinzip des Electrofreezings basierendes Kryomikroskop, das in Abb. 3.11 dargestellt ist [155], [156], [157]. Hiermit wurde die Nukleationstemperatur sowie der Einfluss der Elektrodengeometrie und die Zusammensetzung der wässrigen Proben auf die Eiskristallbildung untersucht. Aufgrund der zellschädigenden hohen elektrischen Feldstärken wurden mit diesem System jedoch keine Zell-Untersuchungen durchgeführt. Unter diesem Kryomikroskop konnte diese Forschergruppe die Hochspannungs-induzierte Nukleation an einer Elektrode visualisieren (Abb. 3.12). Schließlich erforschte Petersen [157] erstmals mit Hilfe eines Electrofreezing-Frierblocks die Abhängigkeit der Vitalität von der Nukleationstemperatur bei der Kryokonservierung humaner Fibroblasten und hämatopoetischer Vorläuferzellen. Dieser Frierblock wurde beim Einfrieren von acht parallel angeordneten Proben eingesetzt. Darüber hinaus wurde diese Technik für die aktive Kontrolle der Nukleationstemperatur bei der Gefriertrocknung eingesetzt [155], [156].

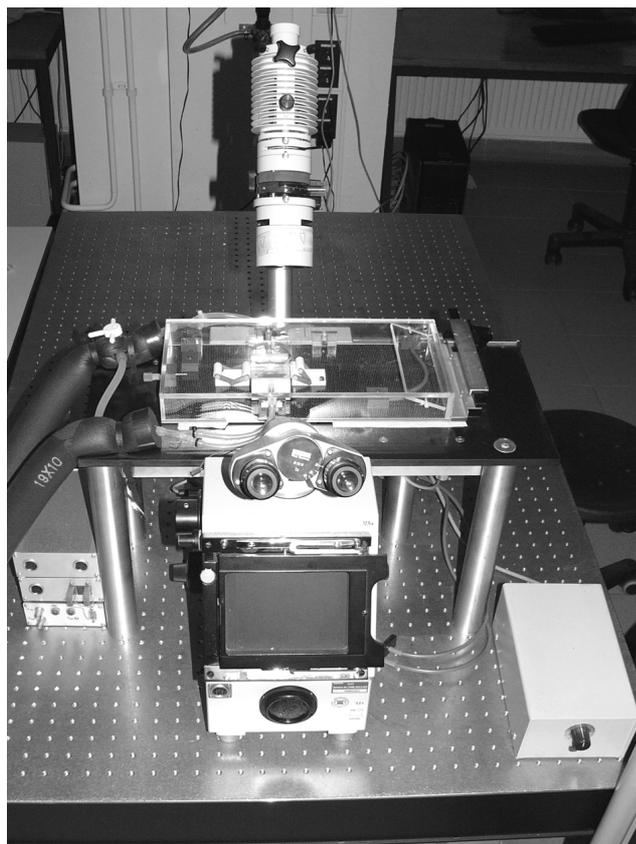


Abb. 3.11: Aufbau des Electrofreezing-Kryomikroskops von Petersen [157] zur Kontrolle und Visualisierung der Eiskristallbildung unter aktiver Kontrolle der Nukleationstemperatur. Die Proben konnten dabei mit Hilfe eines Kryostaten (HAAKE C75P von Thermo Electron Corporation) mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch als Kühlmittel bis auf maximal -30°C gekühlt werden.

Zur Kontrolle der Nukleationstemperatur kann in Fluiden eine Kavitation erzeugt werden. Im Fall der akustischen Kavitation werden durch Beaufschlagung einer genügend hohen Ultraschalleistung Kavitationsblasen in der unterkühlten Probe erzeugt, die beim Kollabieren zu einer Nukleation führen. Den Einfluss von Ultraschall auf das Kristallisationsverhalten von reinem Wasser wurde von Inada et al. beschrieben. Sie fanden heraus, dass Ultraschall die Eiskristallbildung fördern kann und das Nukleationsverhalten stark von der Intensität der erzeugten Kavitationen abhängt [85]. Chow et al. gelang es mit Hilfe von Ultraschall bei einer Frequenz von 20 kHz die primäre Nukleation in Saccharoselösung zu erzeugen, wobei die Nukleationstemperatur mit steigenden Ultraschalleistungen und Tastverhältnissen anstieg [36]. Delgado et al. nutzen Ultraschall mit 40 kHz bei einer Leistung von ~130 W, um die Nukleationstemperatur von gekühlten Apfel-Zylindern zu erhöhen und sie schlussfolgerten aus ihren Experimenten, dass Ultraschall die primäre Nukleation erhöhen kann [41]. Nakagawa et al. konnte die Sublimationsraten während der Gefriertrocknung von pharmazeutischen Rezepturen durch höhere Nukleationstemperaturen steigern, indem sie Ultraschall bei einer Frequenz von ~36 kHz einsetzten [143]. Diese, hier auf Ultraschall basierenden Nukleations-Experimente führten zu akustischen Kavitationsblasen und lagen alle unterhalb der bis dato technisch maximalen erzeugbaren Ultraschall-Frequenzen von 20 GHz und lag damit deutlich unterhalb der Resonanzfrequenz von Eis bei 26 GHz [147].

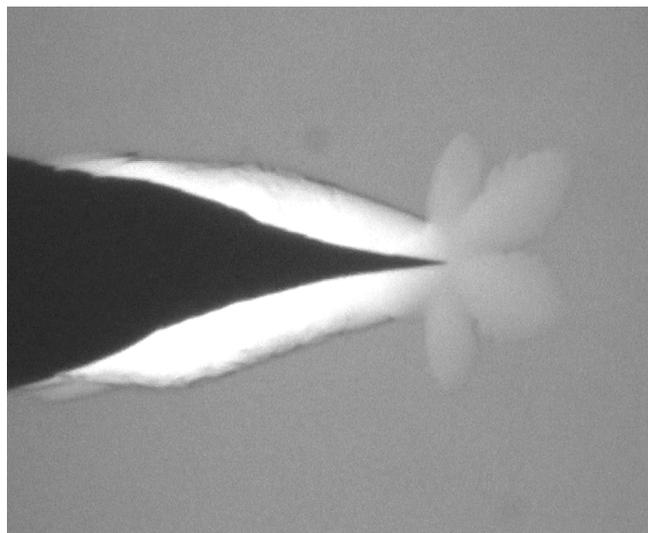


Abb. 3.12: Elektrof freezing-Elektrode unter dem Kryomikroskop. Nach Anlegen eines 3 kV-Spannungspulses (Pulsdauer: 2,5 ms) erfolgte die Nukleation und das Eiskristallwachstum in der unterkühlten Lösung [155], [156].

Im Gegensatz dazu wurde auch die optische Kavitation zur Nukleation von Fluiden eingesetzt. Hierbei ionisiert Laserlicht die im Fokus befindlichen Wassermoleküle, welche verdampfen (optischer Durchbruch), expandieren und schließlich implodieren und dadurch eine Nukleation initiieren. Krüger et al. nutzen einen Titan:Saphir-Femtosekundenlaser bei 800 nm, um unterkühlte, übersättigte KCl- und NaCl- Lösungen zu nukleieren [109]. Lindinger et al. konnten mit Hilfe eines Nd:Yag-Lasers bei 1064 nm unterkühltes Wasser nukleieren. Diese Forschergruppe nahm an, dass hierfür die homogene Nukleation in der komprimierten Flüssigkeitsphase verantwortlich ist [120].

3.3.3 Einfluss der Nukleationstemperatur auf das zelluläre osmotische Verhalten

Als Prozessparameter während der Kryokonservierung hat die Nukleationstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf das osmotische Verhalten, die Dehydrierung und die intrazelluläre Eiskristallbildung von Zellen. Ross-Rodriguez et al. simulierten das relative Zell-Volumen von hämatopoetischen Stammzellen während des langsamen Kühlens und einer Haltezeit von 3 min bei -20°C unter Variation der Nukleationstemperatur. Sie zeigten, dass bei hohen Nukleationstemperaturen, bei $T_n = -3^{\circ}\text{C}$, das zelluläre Schrumpfen langsamer erfolgt im Vergleich zu tieferen Nukleationstemperaturen, wie bei $T_n = -20^{\circ}\text{C}$. Die weitere Kühlung erfolgte in diesen Experimenten jedoch bei hohen Kühlraten von 250 K/min, sodass ein maximales Schrumpfen der Zellen nicht ermittelt wurde [170]. Wolkers et al. zeigten, dass die Kooperativität, eine Eigenschaft der Zellmembranen bei der Phasenumwandlung, linear mit der Nukleationstemperatur ansteigt. Zu diesen Ergebnissen gelangen sie nach Experimenten an Tumorzellen, wobei sie einen Anstieg der Kooperativität bei $T_n = -3^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zu $T_n = -10^{\circ}\text{C}$ verzeichneten [208].

Der Einfluss der Nukleationstemperatur auf die intrazelluläre Eiskristallbildung (IIF) wurden von Pitt et al. an Roggen-Protoplasten untersucht. Sie zeigten, dass sich deren IIF-Kinetik von 1700 s bei $T_n = -4^{\circ}\text{C}$ auf unter 1 s bei $T_n = -18,5^{\circ}\text{C}$ verringerte [159]. Trad et al. verringerten die intrazelluläre Eiskristallbildung bei der Kryokonservierung von humanen Oozyten, indem sie diese bei hoher Nukleationstemperatur bei $T_n = -4,5^{\circ}\text{C}$ aktiv nukleierten [199]. Bernemann et al. variierten die Kühlrate und Me_2SO -Konzentration beim Einfrieren von humanen Keratinozyten in einem automatischen Einfriergerät (CM2000, Carbueros Metalicos, Spanien). Sie fanden heraus, dass bei höheren programmierten Kühlraten die Nukleationstemperatur der Proben anstieg [24].

3.3.4 Einfluss der Toxizität von Frierschutzmitteln auf die Überlebensrate

Die toxischen Effekte von *Membran-permeierenden Frierschutzmitteln* auf die Überlebensraten bei hypothermen Temperaturen wurden in einer Vielzahl von zellulären Systemen experimentell untersucht, darunter Herzzellen der Ratte [11], Leber-Endothelzellen der Ratte [162], humane hämatopoetische Stammzellen [171], humane Corneas [181], Kaninchen-Arterien [211], Garnelen-Embryos [124], Zebrafisch-Oozyten [160], Schmerlen-Spermien [105], Spermien der Maus [95], Gelenkknorpel vom Schwein [54] sowie bei der Stechmücke *Anopheles gambiae* [122]. Diese Experimente zeigten einen einheitlichen Abfall der Überlebensrate bei höheren Konzentrationen und fortschreitender Einwirkzeit an Frierschutzmitteln, darunter Dimethylsulfoxid, Ethylenglycol und Glycerin (vgl. Tab. 3.1).

Neben den klassischen Frierschutzmitteln wurden für die Kryokonservierung *Eis-Blocker* (engl.: synthetic ice blocker, SIB) wie 1,3-Cyclohexantriol und 1,4-Cyclohexandiol untersucht [57], welche in Kombination mit Membran-permeierenden Frierschutzmitteln keine erhöhte Toxizität aufwiesen [66]. Ein Grund für die geringe Toxizität von Eis-Blockern ist, dass sie bereits bei sehr geringen Konzentrationen wirken, indem sie eine Nukleation verhindern. Zu den Eis-Blockern zählen die Polyvinylalkohole, die ab einer Konzentration von nur 0,0001% eine Nukleation hemmen konnten [210].

Nicht-Membran-permeierende Frierschutzmittel wie Trehalose, Hydroxyethylstärke, Prolin, Ectoin und Anti-Frost-Proteine werden im Allgemeinen bei den in der Kryokonservierung üblichen Konzentrationen als nicht-toxisch eingestuft. Insbesondere werden dort Anti-Frost-Proteine eingesetzt, da diese selektiv mit Nukleatoren interagieren und eine Nukleation vermeiden können [154].

In Anwesenheit von Eis lässt sich der Einfluss der Toxizität von Frierschutzmitteln auf die Überlebensrate experimentell erschwert bestimmen, da die Aufkonzentration von Frierschutzmitteln mit der Anreicherung an Elektrolyten einhergeht. In einer Studie beim langsamen Einfrieren von Erythrozyten mit Glycerin wurde gezeigt, dass Natriumchlorid-Konzentrationen die Überlebensraten umso drastischer verringern, je weniger Frierschutzmittel im Bereich von 0 bis 1,5 M im isotonen Zustand vorhanden war. Unter Einhaltung eines konstanten *R*-Wertes (vgl. Abschnitt 3.1.2) wurde ermittelt, dass die Salzkonzentration in der Probe die Überlebensrate nur dann signifikant beeinflusst, wenn deren Eis-Anteil 75 bis 90% beträgt [134]. In einem Übersichtsartikel wurden Auswertungen von Experimenten an Erythrozyten mit Dimethylsulfoxid rekapituliert. Hieraus zeigte sich, dass eine Hämolyse nicht vom Eis-Anteil abhängig war, sondern nur von der Molarität an Dimethylsulfoxid und

Natriumchlorid in der Probe, woraus geschlussfolgert wurde, dass Frierschutzmittel-bedingte Schädigungen an den Erythrozyten aufgetreten sind [56]. Kürzlich wurde von Evertz et al. ein System (Mikrofreezer[®]) entwickelt, das eine kontrollierte Abkühlung von bis zu 96 wässrigen Proben erlaubt [55]. Aufgrund der großen Anzahl an Proben werden durch Variation der Frierschutzmittel-Konzentration und anschließender Vitalitätstests Toxizitäts-Untersuchungen vereinfacht. Das Prinzip des Mikrofreezers[®] ist in Abb. 3.13 dargestellt.

Es existieren einige mathematische Modelle, die die Toxizität von Frierschutzmitteln vorhersagen können. Zur Abschätzung der Toxizität von Frierschutzmitteln wurde der qv^* -Wert eingeführt. Dieser erscheint proportional zu der durchschnittlichen Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen seines Frierschutzmittels und ist aus dem Verhältnis der Molarität von Wasser einer Frierschutzmittel-Lösung zu der Molarität der polaren Gruppen einer Frierschutzmittel-Lösung definiert. Dabei zeigen höhere qv^* -Werte eine höhere Toxizität an. In Experimenten mit Kaninchen-Nieren wurden kortikale Gewebeschnitte angefertigt, diese mit verschiedenen Frierschutzmittel-Lösungen mit errechneten qv^* -Werten beaufschlagt und anschließend mit Hilfe der $[K^+]/[Na^+]$ -Methode auf Vitalität getestet. Abhängig von den verwendeten Frierschutzmittel-Konzentrationen und Arten, darunter auch Dimethylsulfoxid und Ethylenglycol, konnte eine gute Korrelation von qv^* -Werten und Vitalität ermittelt werden ($R^2 = 0,87$) [57].

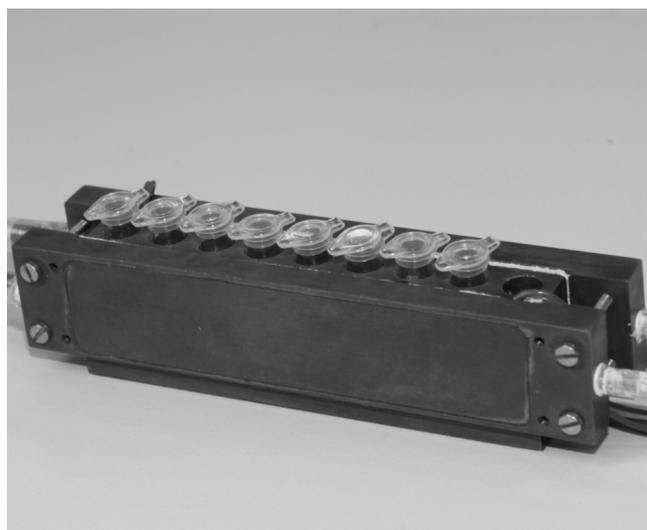


Abb. 3.13: Prinzip des Mikrofreezers[®] für 8 PCR-Röhrchen. Das System wird mit Flüssigstickstoff gekühlt und seitlich mit Heizfolien kontrolliert beheizt [55].

Kürzlich wurde von Lawson et al. eine Methode zur Simulation der Zytotoxizität von Membran-permeierenden Frierschutzmitteln entwickelt [114]. Dazu wurde zunächst ein Transportmodell für den Frierschutzmittel-Stofftransport und den Wärmetransport in Alginat-Beads und artikulären Knorpel erstellt. Des Weiteren wurden für die Frierschutzmittel Dimethylsulfoxid und Propandiol ein mathematisches Model nach Char et al. [35] genutzt und an experimentelle Toxizitätsmessungen von Lawson et al. [113] angepasst. Deswegen konnte der Einfluss der Frierschutzmittel-Toxizität auf die Zell-Überlebensrate erstmalig berechnet werden [114].

Ist bei einem Frierschutzmittel der toxische Einfluss auf die Zell-Überlebensrate quantifizierbar und das Phasendiagramm des Frierschutzmittel bekannt (vgl. Abschnitt 3.1.2), so kann die Toxizität minimiert und hieraus die Überlebensrate maximiert werden. Pegg et al. entwickelten in Kooperation mit der Firma Planer[®] die *Liquidus tracking-Methode*, die zu optimalen Kryokonservierungs-Protokollen unter Minimierung der Zytotoxizität führte [152]. Hierbei wurde den biologischen Proben, artikulärer Knorpel, Dimethylsulfoxid während der Temperaturenniedrigung bzw. -erhöhung stufenweise hinzugefügt, sodass die Temperatur der Lösung immer und überall in der Probe oberhalb der Liquiduskurve lag (vgl. Abb. 3.6) [152], [203].

3.3.5 Einfluss von Frierschutzmitteln auf das zelluläre osmotische Verhalten

Das osmotische Verhalten von Zellen wird entscheidend von der Art und Konzentration an Frierschutzmitteln beeinflusst. Pegg et al. nutzten das ternäre System NaCl-Me₂SO-H₂O, um das relative Zell-Volumen bei 0°C und -100°C zu berechnen und schlussfolgerten, dass der Einsatz von höheren Me₂SO-Konzentrationen von 0 M bis 2 M zu einem geringeren Zell-Schrumpfen führt [150]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Weng et al., die kürzlich ein Modell entwickelten, um die Dehydrierung von hypothetischen sphärischen Zellen während der Kryokonservierung zu quantifizieren. Sie nutzten hierbei osmotische viriale Gleichungen zweiter Ordnung und konnten auf diese Weise das nicht-lineare Lösungsverhalten simulieren. Insbesondere berechneten sie das Schrumpfen dieser Zellen bei 5 K/min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Frierschutzmitteln wie Me₂SO, Ethylenglycol und Glycerin und zeigten, dass das Zell-Schrumpfen mit höheren Frierschutzmittelkonzentrationen bei Molaritäten von 1 M bis 3 M geringer wird [204]. Smith et al.

untersuchten das relative Zell-Volumen von Hepatozyten der Ratte während des Gefrierens bis -25°C mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me_2SO (0 M, 1 M und 2 M). Sie zeigten, dass das Zell-Schrumpfen bei höheren Frierschutzmittelkonzentrationen und höheren Kühlraten weniger ausgeprägt war [180]. Den Einfluss der Frierschutzmittel Me_2SO und Glycerin (0 M bis 2 M) auf die intrazelluläre Eiskristallbildung wurde von Rall et al. beim schnellen Einfrieren ($\sim 18 \text{ K/min}$) von Maus-Embryonen untersucht. Während es ohne Frierschutzmittel bei -10°C bis -15°C zur intrazellulären Eiskristallbildung kam, erfolgte diese mit Frierschutzmittel bei tieferen Temperaturen bei -38°C bis -44°C [167].

4 THEORETISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.1 Wärmetransport

4.1.1 Simulation der Temperaturverteilung

Zur Erlangung eines tieferen Verständnisses der im Kapitel 5 beschriebenen experimentellen Untersuchungen werden hier zunächst entsprechende theoretische Betrachtungen erläutert, welche den Verlauf der experimentellen Untersuchungen maßgeblich bestimmten. Die experimentellen Untersuchungen umfassten eine Reihe von unterschiedlichen Messmethoden, die es erlaubten, neue Erkenntnisse über den Einfluss der Kryokonservierung auf biologisches Material zu gewinnen. Für einen späteren Vergleich der Ergebnisse der experimentellen Methoden untereinander war es unabdingbar, die exakten Bedingungen wie die Temperaturverteilung der Probe, die Probengeometrie sowie die Zelldichte für jede Messmethode zu bestimmen. Zusätzlich mussten weitere Einflussparameter wie Variationen in der Probenvorbereitung sowie Messfehler ebenfalls für jede Messmethode abgeschätzt werden.

Die theoretische Analyse der Temperaturverteilung in der Probe wurde mit Hilfe der rechnergestützten Konstruktions-Software SolidWorks[®] durchgeführt. Hierzu wurden zunächst dreidimensionale rechnergestützte Modelle entwickelt. Diese Modelle bildeten die für die Analyse der Temperaturverteilung relevanten realen Geometrien und Materialeigenschaften der Probe sowie deren Probengefäße ab. Zum Einsatz kamen hier die Materialien Quarzglas, Kupfer, Kalziumfluorid, Polytetrafluorethylen, Polypropylen und Wasser. Da Zellen zu einem großen Anteil aus Wasser bestehen (ca. 60-85%) [66] und die genutzten realen Proben als Zellsuspension oder als Zellpellet zusätzlich im Extrazellularraum wasserhaltiges Kulturmedium enthalten, wurde die Probe hier vereinfacht als Wasser modelliert. Dabei wurde der Phasenwechsel von Wasser mitberücksichtigt, indem die spezifische Wärme von Wasser bei einer definierten Nukleationstemperatur $T_n = -4$ bis -5°C extrem hohe Werte von $1,2 \cdot 10^5 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ annahm und damit der methodischen Herangehensweise der *Enthalpie-Schätz-Methode* nach Rabin et al folgte. [165]. Nach dem Erstellen der rechnergestützten Modelle folgte die Simulation mit der *Finite-Elemente-*

Methode (FEM). Zuerst wurde ein für die Berechnung erforderliches FEM-Netz erzeugt. Danach wurden mit dem Festlegen der Temperatur-, Konvektions- und Wärmeflusswerte an die Geometrien der Modelle die Randbedingungen festgelegt. Die FEM-Simulation begann mit einer instationären Wärmeberechnung und wurde dann in eine stationäre Wärmeberechnung überführt. Schließlich wurde die Temperaturverteilung in den dreidimensionalen, rechnergestützten Modellen in einer Farbcodierung dargestellt.

4.1.2 Temperaturverteilung dünn-schichtiger Proben bei der Kryomikroskopie

Eine in dieser Arbeit intensiv genutzte Messmethode war die Kryomikroskopie. Hiermit konnten dünn-schichtige Proben ($\sim 20 \mu\text{m}$ bis $500 \mu\text{m}$) von 125°C bis -196°C bei definierten Kühl- und Heizraten von bis zu 130 K/min kontrolliert temperiert werden. Gleichzeitig war eine mikroskopische digitale Bild- und Videoaufzeichnung möglich. Die Proben befanden sich hierbei innerhalb einer Linkam Frierkammer FDCS196, die in [Abb. 4.1](#) als SolidWorks®-Modell in einem geöffneten Zustand dargestellt ist. Üblicherweise wurde diese Frierkammer im Betrieb mit einem Deckel verschlossen, um eine Stickstoff-Atmosphäre im Inneren der Frierkammer zu gewährleisten und damit ein Kondensieren feuchter Umgebungsluft bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Die Probe wurde von einem Quarztiegel im Gesichtsfeld des Mikroskops gehalten, der mit Hilfe einer XY-Positionierung verschieblich ist. Ein mit dem Quarztiegel in direkten Kontakt unterhalb stehenden Silberblock wurde mit Flüssigstickstoff durchspült und gleichzeitig geheizt. Dies erlaubte dem System die Silberblocktemperatur zu regeln, die von der Proben-temperatur bei hohen Kühl- und Heizraten abweichen konnte. Ein zentrales Loch im Silberblock ermöglichte das Mikroskopieren im Durchlicht.

Die Frage entstand, ob der Silberblock beim Kühlen der Probe die Wärme mit homogener Temperaturverteilung im stationären Betrieb abführen kann. Hierzu lagen folgende Bedingungen vor: 1) nach optimaler Reinigung von Quarztiegel und Silberblock standen deren Kontaktflächen aufgrund derer Planarität mit vernachlässigbarem Lufteinschluss in Kontakt. 2) Die Wärmeleitfähigkeiten der verwendeten Materialien, Quarzglas: $1,38 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ und Silber: $419 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, waren relativ hoch [99]. 3) Trotz des zentralen Lochs im Silberblock konnte eine Köhlersche Beleuchtung eingestellt werden. Absorptions-Effekte von Licht in der Probe durch Wärmestrahlung konnte als vernachlässigbar angesehen werden, da eine Kaltlichtquelle verwendet wurde.

Die Abb. 4.2a zeigt das SolidWorks®-Modell eines Quarztiegels mit einem Kupfer-Metallstab für die Auslösung einer Nukleation einer wässrigen Probe. Unter den Randbedingungen, dass der Silberblock auf -30°C abgekühlt ist und in der Frierkammer anfänglich Raumtemperatur herrschte, stellte sich im stationären Zustand die Temperaturverteilung entsprechend Abb. 4.2b ein. Diese FEM-Simulation veranschaulicht, dass der Quarztiegel unter diesen Bedingungen im gesamten Bodenbereich eine homogene Wärmeabfuhr erfuhr. Da in dieser Arbeit hauptsächlich mit sehr geringen Kühlraten im Bereich von 0,1 bis 5 K/min gearbeitet wurde, kann mit einer homogenen Wärmeabfuhr am Boden des Quarztiegels gerechnet werden. Zusätzliche FEM-Simulationen bei extrem hohen Kühlraten (~ 800 K/min) führten zu einer Inhomogenität am äußeren Rand des Quarztiegelbodens. Da das Gesichtsfeld des Mikroskops sich in der zentralen Mitte des Silberblocks und Quarztiegels befand, sind solche Inhomogenitäten erst bei sehr viel höheren Kühlraten praxisrelevant.

4.1.3 Temperaturverteilung zylinderförmiger Proben in Kryoröhrchen

In der Kryokonservierung kommen häufig kommerzielle zylinderförmige Kryoröhrchen zum Einsatz. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit 1 mL-Zellsuspensionen mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL in Kryoröhrchen eingefroren. Wie in Abschnitt 3.2.3 erläutert, wurde der Temperaturverlauf beim Gefrieren *innerhalb* von zylinderförmigen wässrigen Proben von Heschel grundlegend beschrieben [77]. Sollen die Proben in mehreren Kryoröhrchen gleichzeitig und möglichst gleichmäßig innerhalb eines Friergerätes gekühlt werden, so hat sich eine parallele Anordnung in Frierblöcken bewährt [155]. Hierbei wurden Kühlkörper eingesetzt, die eine gleichmäßige Wärmeabfuhr gewährleisteten. Abb. 4.3 zeigt ein SolidWorks®-Modell einer prinzipiellen Anordnung eines Frierblocks. In diesem Modell wurden 8 Kryoröhrchen mit In-Stoppfern® von einer Leiste aus Polytetrafluorethylen (PTFE) parallel gehalten. Diese PTFE-Leiste wirkte als Wärmespeicher und ermöglichte die Messung von Temperaturänderung beim Phasenwechsel der Proben mittels Thermoelementen (hier nicht dargestellt). Seitlich angebrachte Kühlkörper dienten der homogenen Verteilung der Temperatur. Für die Simulation der Temperatur wurde ein SolidWorks®-Modell eines Kryoröhrchens mit IN-Stoppfern® und einem PTFE-Röhrchens zur Auslösung der Nukleation aufgebaut (Abb. 4.4).

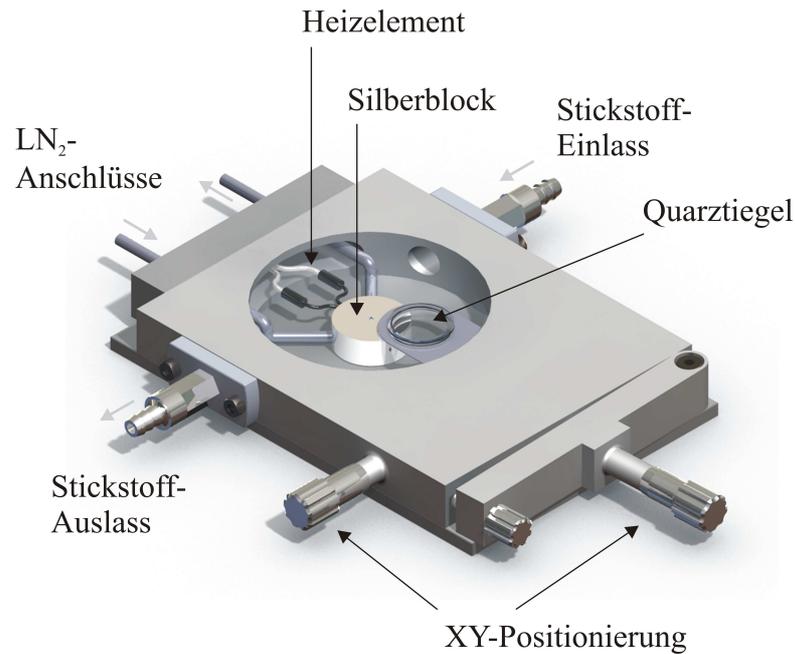


Abb. 4.1: SolidWorks®-Modell einer Linkam Frierkammer FDCS im geöffneten Zustand ohne Deckel. Der Quarztiegel, der mit der XY-Positionierung verschieblich ist, liegt zur besseren Übersicht seitlich neben dem Silberblock. Außerdem sind die Anschlüsse für Flüssigstickstoff (LN_2) und gasförmigen Stickstoff mit Richtungsangaben (graue Pfeile) der Massenströme sowie das Heizelement gezeigt.

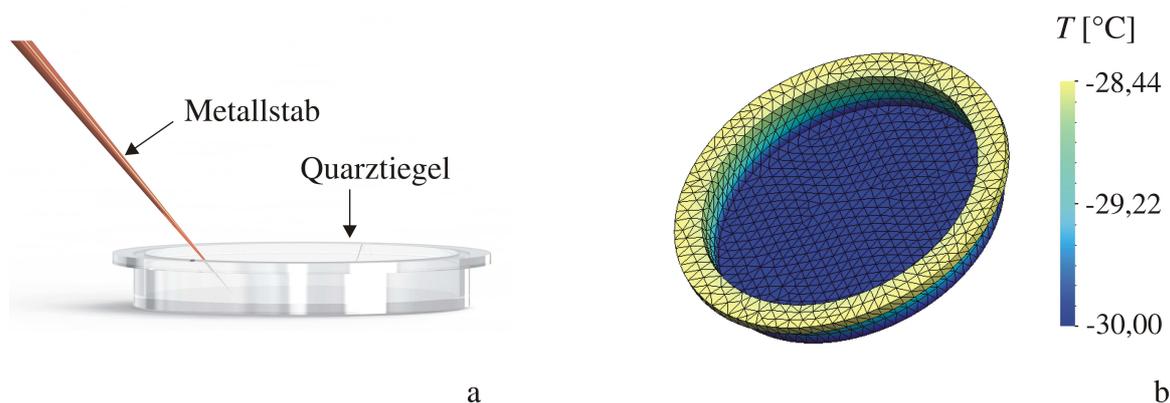


Abb. 4.2: SolidWorks®-Modell eines Quarztiegels für die Probenaufnahme unter einem Kryomikroskop und einem spitzen Metallstab zur Auslösung der Nukleation einer unterkühlten wässrigen Probe (a). SolidWorks®-FEM-Simulation der Temperaturverteilung eines Quarztiegels mit FEM-Netz. Auf dem Boden des Quarztiegels herrschte eine homogene Temperaturverteilung von -30°C , hier dunkelblau dargestellt (b).

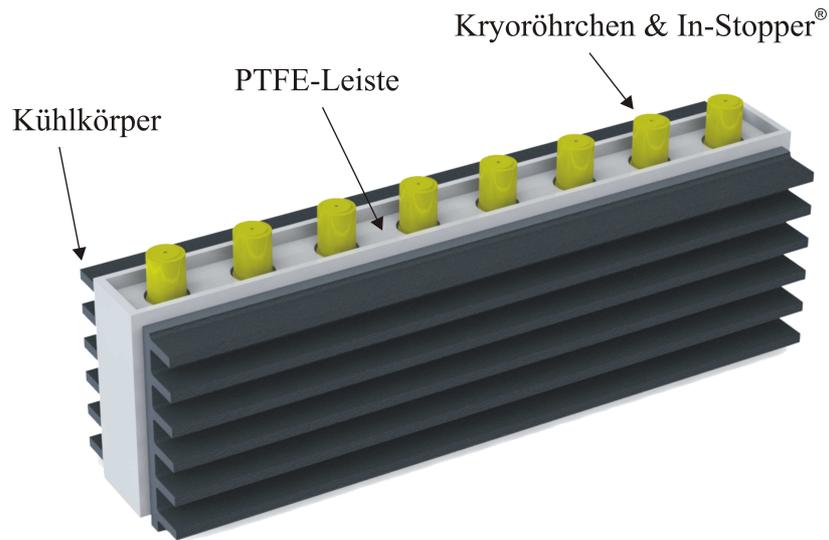


Abb. 4.3: SolidWorks®-Modell eines prinzipiellen Aufbaus eines Frierblocks mit 8 Kryoröhrchen und In-Stopper®. Eine PTFE-Leiste diente dem parallelen Halten der Kryoröhrchen und diente gleichzeitig als Wärmespeicher, was eine Temperaturmessung mit innen liegenden Thermoelementen ermöglichte. Zusätzlich wurden Kühlkörper angebracht, die eine homogene Wärmeabfuhr beim Kühlen gewährleisteten.

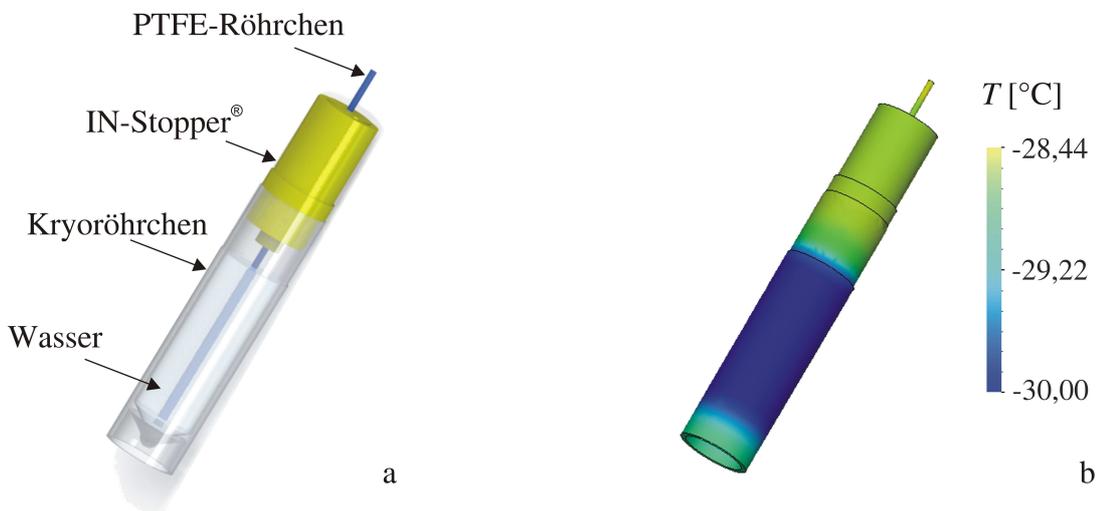


Abb. 4.4: SolidWorks®-Modell eines Kryoröhrchens mit dem Probenmaterial Wasser: Das Kryoröhrchen war mit einem IN-Stopper® verschlossen und mit einem PTFE-Röhrchen verbunden, das für die kontrollierte Auslösung der Nukleation eingesetzt wurde (a). SolidWorks®-FEM-Simulation der Temperaturverteilung der Anordnung: Die Wärme wurde seitlich am Kryoröhrchen abgeführt, wodurch die Probe eine homogene Temperaturverteilung von -30°C erfuhr, hier dunkelblau dargestellt (b).

Das Kryoröhrchen sowie das PTFE-Röhrchen enthielt als Probenmaterial Wasser. Für die FEM-Simulation wurde die seitliche Mantelfläche, die im direkten Kontakt zur PTFE-Leiste steht, auf -30°C gesetzt. Alle anderen Geometrien des Modells aus [Abb. 4.4](#) wurden anfänglich auf Raumtemperatur festgelegt. Unter diesen Bedingungen ergab sich die in [Abb. 4.4b](#) dargestellte Temperaturverteilung. Hieraus lässt sich erkennen, dass das Kryoröhrchen an der seitlichen Mantelfläche eine homogene Temperaturverteilung (dunkelblaue Färbung) aufweist. Am Boden des Kryoröhrchens kann es jedoch zu Inhomogenitäten der Temperaturverteilung kommen, die vor allem dann eine große Rolle spielen, wenn Zellen in diesen Bereich teilweise oder komplett sedimentieren.

4.1.4 Temperaturverteilung dünn-schichtiger Proben bei der FTIR

Die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR) wurde in dieser Arbeit mit einem Flüssigstickstoffsystem kombiniert, um das Infrarotspektrum von wässrigen Proben während der Kryokonservierung zu erfassen. Aus dem Infrarotspektrum können die molekularen Schwingungen von Molekülen in der Probe abgeleitet werden. Die Effekte der Temperatur, der Osmolarität und der Eiskristallbildung auf Zellen können in verschiedenen Bereichen des Infrarotspektrums, in sogenannten Bändern, ermittelt werden. Hierzu zählen Veränderungen im symmetrischen CH_2 -Streckschwingungs-Band (Lipid-Band), dem $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungs-Band der Peptidgruppe (Amid-I-Band) und dem H_2O -Band [18], [103]. Eine detaillierte Darstellung der FTIR-Methode wird im experimentellen Teil in Kapitel 5 beschrieben.

In dem verwendeten FTIR-Aufbau war die Probe innerhalb eines Probenhalters angeordnet, welcher in [Abb. 4.5](#) als SolidWorks[®]-Modell dargestellt ist. Der reale FTIR-Probenhalter wurde zur Kühlung mit Flüssigstickstoff durchspült und wurde gleichzeitig durch eingebaute Heizelemente erwärmt, wodurch eine exakte Temperierung der Anordnung möglich war. Die wässrige Probe wurde dabei zwischen zwei CaF-Fenstern und einem PTFE-Ring platziert ([Abb. 4.6a](#)). Für die FEM-Simulation der Temperaturverteilung wurden als Randbedingungen die Kontaktflächen zwischen CaF-Fenster und Probenhalter auf -30°C und alle restlichen Geometrien auf Raumtemperatur gesetzt. [Abb. 4.6b](#) veranschaulicht die im stationären Betrieb entstehende Temperaturdifferenz von 1,43 K zwischen äußerem Rand und der Mitte der CaF-Fenster.

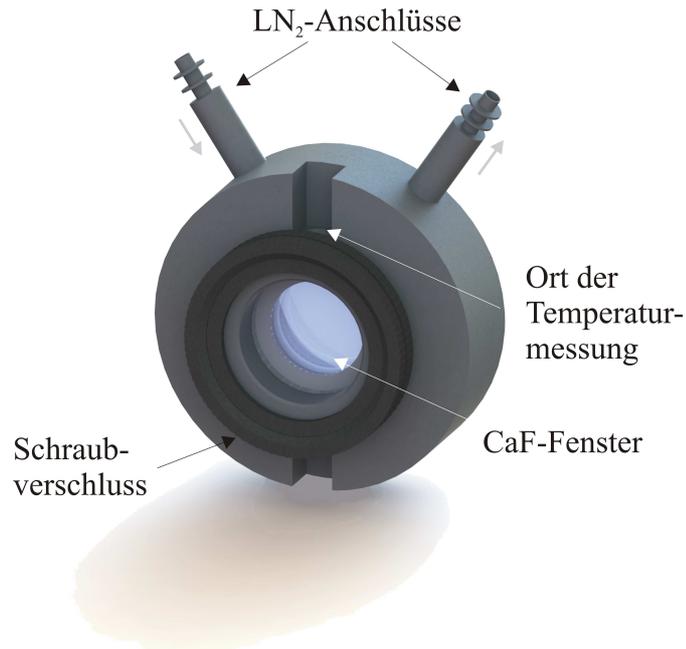


Abb. 4.5: SolidWorks®-Modell des FTIR-Probenhalters mit CaF-Fenster, Schraubverschluss und LN₂-Anschlüssen. Die grauen Pfeile deuten den Massenstrom des Flüssigstickstoffes an. Zusätzlich ist der Ort der Temperaturmessung angegeben. Während einer FTIR-Messung wurde die Probe über die CaF-Fenster beleuchtet und das transmittierte Infrarotlicht zur Ermittlung dessen Spektrums detektiert.

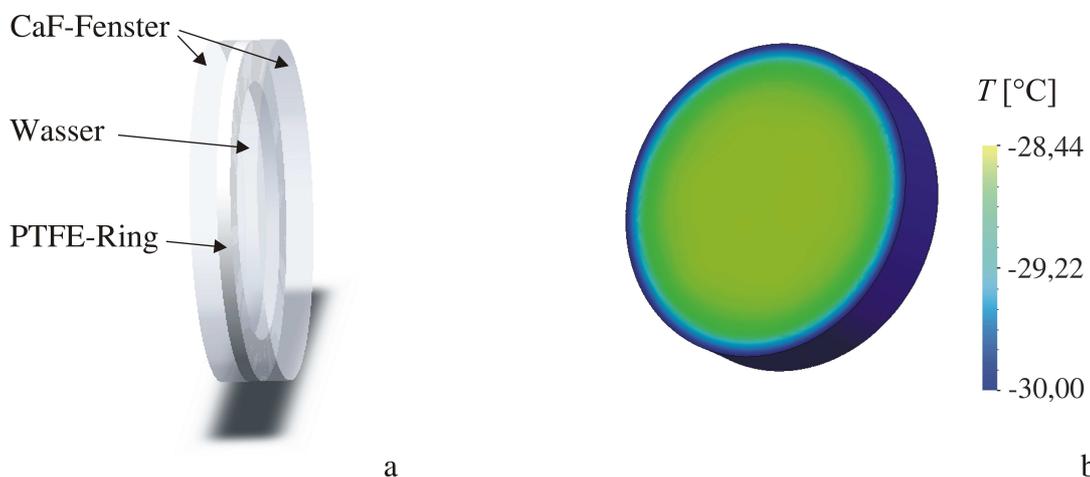


Abb. 4.6: SolidWorks®-Modell der Probenanordnung in einem Fourier-Transform Infrarotspektrometer (FTIR). In diesem Modell wurde als Probenmaterial Wasser gewählt, das zwischen zwei CaF-Fenstern und einem PTFE-Ring eingeschlossen ist (a). SolidWorks®-FEM-Simulation der Temperaturverteilung dieser Probenanordnung: Die Wärme wurde am äußeren Rand des CaF-Fensters und des PTFE-Ringes entzogen, hier bei -30°C in dunkelblau dargestellt. In der Mitte der Anordnung herrschte eine homogene Temperaturverteilung, hier gelb dargestellt (b). In der realen Versuchsanordnung befand sich am äußeren Rand der Sensor für die Temperaturregelung. Die Proben temperatur in der Mitte der Anordnung wich deshalb von der gemessenen Temperatur um 1,43 K ab.

In der experimentellen Versuchsanordnung erfolgte die Ausleuchtung der Probe innerhalb des Probenhalters nur in der radialen Mitte, in der bei niedrigen Kühlraten (~ 1 K/min) eine homogene Temperaturverteilung sichergestellt war. Höhere Kühlraten hatten systembedingt den Nachteil, dass diese bei tiefen Temperaturen ($< -50^\circ\text{C}$) nichtlinear wurden, weshalb in den praktischen FTIR-Experimenten hier mit 1 K/min gekühlt wurde.

Bei der FTIR-Analyse von Zellen werden diese üblicherweise in hohen Dichten als Zellpellets eingesetzt, um ein ausgeprägtes spektroskopisches Messsignal zu erhalten [208]. Im Vergleich zu Zellsuspensionen haben Zellpellets jedoch unterschiedliche Eigenschaften: Sie haben einen nur sehr geringen Anteil an extrazellulärem Wasser und einen hohen Anteil an Zell-Zell-Kontakten. Dies führt zu einem veränderten Stofftransport und osmotischen Verhalten und beeinflusst somit die Kryokonservierung dieser Zellen.

4.2 Stofftransport

4.2.1 Transportmodell der Kryokonservierung von Zellen

In dieser Arbeit wurde ein aus der Literatur bekanntes und etabliertes Transportmodell [75], [216] der Kryokonservierung von Zellen genutzt, um das osmotische Verhalten, insbesondere die Dehydrierung von humanen Endothelzellen der Lunge (HPMEC) beim Einfrieren zu simulieren. Dieses Modell wurde ursprünglich von Levin et al. [119] entwickelt und beschreibt beim Abkühlen mit konstanter Kühlrate den Zusammenhang zwischen dem Zell-Volumen V und der Zeit t oder der Temperatur T . Während die Gleichung 3.28 den Zusammenhang der zeitlichen Änderung des osmotisch aktiven Zell-Volumens V_{cv} von der Temperatur beschreibt, kann das Modell bei konstanter Kühlrate B auch wie folgt dargestellt werden [43]

$$\frac{dV}{dT} = \frac{L_p ART}{B v_w} \cdot \left[\ln \left(\frac{(V - V_b) - (n_s v_s + n_{CPA} v_{CPA})}{(V - V_b) - (n_s v_s + n_{CPA} v_{CPA}) + v_w (\psi_s \cdot n_s + n_{CPA})} \right) \right] - \frac{\Delta H_f}{R} \left(\frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right) \quad (4.1)$$

wobei L_p nach Gleichung 3.29 auch von der Temperatur T und der Aktivierungsenergie E_{Lp} abhängt. Das Modell setzt mehrere vereinfachende Bedingungen voraus [91]:

- Vernachlässigung von Temperatur und Druckdifferenzen über Zellmembranen
- Vernachlässigung von Effekten der intrazellulären Eiskristallbildung
- Vernachlässigung der Fluxes von Frierschutzmitteln und Salzen über der Zellmembran
- durch die Zellmembran limitierter Wassertransport (Peclet-Zahl $Pe \ll 1$)
- vernachlässigbarer Wassertransport unterhalb von -60°C
- ideale Verdünnung der Medien
- Annahme einer konstanten effektiven Zellmembran-Oberfläche A
- Annahme einer konstanten Latentwärme ΔH_f

Zur Erhöhung der Genauigkeit des Modells wird hier die Temperaturabhängigkeit der Latentwärme mitberücksichtigt. Basierend auf den Messergebnissen von Dougherty et al. [48] kann die Latentwärme im Temperaturbereich von 236 K bis 274 K durch ein Polynom 2. Ordnung mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,98$ analytisch angenähert werden, durch:

$$\Delta H_f = -8101,05 + 109,54 \cdot T - 0,21 \cdot T^2 \quad (4.2)$$

Zusätzlich wurden die osmotischen Parameter für das Zellmodell (HPMEC) experimentell bestimmt, darunter das osmotisch inaktive Zell-Volumen V_b (Anhang 10.3.2), die hydraulische Membran-Konduktivität L_p , die Aktivierungsenergie E_{Lp} und die effektive Zellmembran-Oberfläche A (Anhang 10.3.3).

4.2.2 Numerische Methode zur Lösung der Gleichungen

Zur Lösung der Gleichung 3.29, Gleichung 4.1 und Gleichung 4.2 wurde ein numerisches Einschrittverfahren, das klassische Runge-Kutta-Verfahren 4. Ordnung, genutzt. Dabei wird eine Näherungsfunktion $V(T_i)$ als gewichtetes Mittel aus den Werten der Differenzialgleichung $f(T, V)$ an geeigneten Stellen und einer vorgegebenen Schrittweite ΔT gebildet. Diese Näherungsfunktion lautet nach Bronstein et al. [32]

$$V(T_i) = V(T_{i-1}) + \frac{\Delta T}{6} \cdot [k_1 + 2 \cdot k_2 + 2 \cdot k_3 + k_4] \quad (4.3)$$

mit den Runge-Kutta-Koeffizienten k_i :

$$k_1 = f(T_{i-1}, V_{i-1}) \quad (4.4)$$

$$k_2 = f\left(T_{i-1} + \frac{\Delta T}{2}, V_{i-1} + \frac{\Delta T \cdot k_1}{2}\right) \quad (4.5)$$

$$k_3 = f\left(T_{i-1} + \frac{\Delta T}{2}, V_{i-1} + \frac{\Delta T \cdot k_2}{2}\right) \quad (4.6)$$

$$k_4 = f\left(T_i, V_{i-1} + \Delta T \cdot k_3\right) \quad (4.7)$$

Diese Näherungsfunktion hat dabei einen Fehler in der Ordnung von ΔT^5 . Bei einer gewählten Schrittweite von $\Delta T = 0,1$ K ergibt sich somit ein kleiner Fehler der numerischen Näherung von $1 \cdot 10^{-5}$ K.

4.2.3 Simulation des Wassertransports

Das Wassertransportmodell aus Abschnitt 4.2.1 wurde mit Hilfe eines neu entwickelten Matlab[®]-Programms erstellt. Zur erleichterten Eingabe der Simulationsbedingungen und Ausgabe der Ergebnisse wurde eine graphische Benutzeroberfläche programmiert (Anhang, [Abb. 10.7](#)). Auf dieser Benutzeroberfläche erfolgte die Auswahl des Zellmodells HPMEC, wodurch dem Programm die experimentell bestimmten osmotischen Parameter der HPMEC-Zellen als Eingangswerte zur Verfügung standen (Anhang, [Abb. 10.4](#)). Des Weiteren wurden die Randbedingungen, darunter Anfangstemperatur, Endtemperatur, Nukleationstemperatur, Anfangs-Zell-Volumen, Kühlrate, Art und Konzentration des Frierschutzmittels sowie die gewünschte Schrittweite eingetragen. Nach dem Starten der Simulation wurden die Ergebnisse der Berechnung in drei graphischen Darstellungen, in einem $T(t)$ -, $V(t)$ - und einem *rel. V(t)*-Diagramm dargestellt (Anhang, [Abb. 10.7](#)). [Abb. 4.7](#) zeigt Ergebnisse von Matlab[®]-Simulationen bei verschiedenen Konzentrationen an Dimethylsulfoxid (0 M, 1 M und 2 M Me₂SO) in einem Diagramm mit zeitlicher Abhängigkeit des relativen Zell-Volumens beim Kühlen. Aus diesen Simulationen folgte, dass höhere Konzentrationen an Frierschutzmitteln zum geringeren Zell-Schrumpfen führte: Bei -60°C beträgt das relative Zell-Volumen 45,1% (ohne CPA), 49,0% (1 M Me₂SO) und 50,0% (2 M Me₂SO). Vergleichbare Ergebnisse für das relative Zell-Volumen bei -60°C lieferten Simulationen mit Ethylenglycol von 51,4% (1 M EG) und 53,8% (2 M EG).

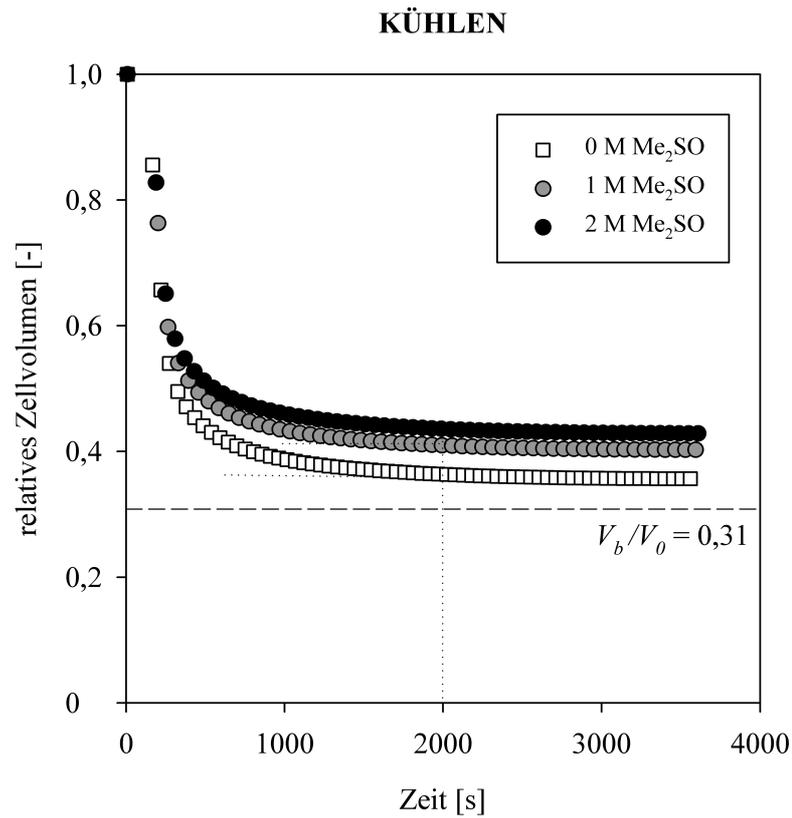


Abb. 4.7: Matlab[®]-Simulation des relativen Zell-Volumens V/V_0 von HPMEC-Zellen beim Einfrieren von 4°C bis -60°C mit 1 K/min unter Variation der Konzentration an Dimethylsulfoxid (0 M Me₂SO weiße Quadrate, 1 M Me₂SO graue Kreise, 2 M Me₂SO schwarze Kreise): Die Simulation zeigt, dass die relativen Zellvolumina nach ~2000 s konstante Werte erreichen. Mit dem hier genutzten Wassertransportmodell nach Devireddy et al. [43] wurden mit steigender Me₂SO-Konzentration geringeres Zell-Schrumpfen beim Kühlen ermittelt.

5 EXPERIMENTELLER AUFBAU UND METHODEN

5.1 Dünnschichtige Zellsuspensionen

5.1.1 Kryomikroskopie

Mit Hilfe der Kryomikroskopie kann experimentell der Einfluss von tiefen Temperaturen auf biologisches Material *in situ* visualisiert und dokumentiert werden. Kürzlich wurde ein Übersichtsartikel von Spindler et al. veröffentlicht, der die verschiedenen Arten der Kryomikroskopie-Systeme und deren Anwendungen näher diskutiert [182]. Der Kryomikroskopie-Messplatz des Institut für Mehrphasenprozesse ist in Abb. 5.1 dargestellt.

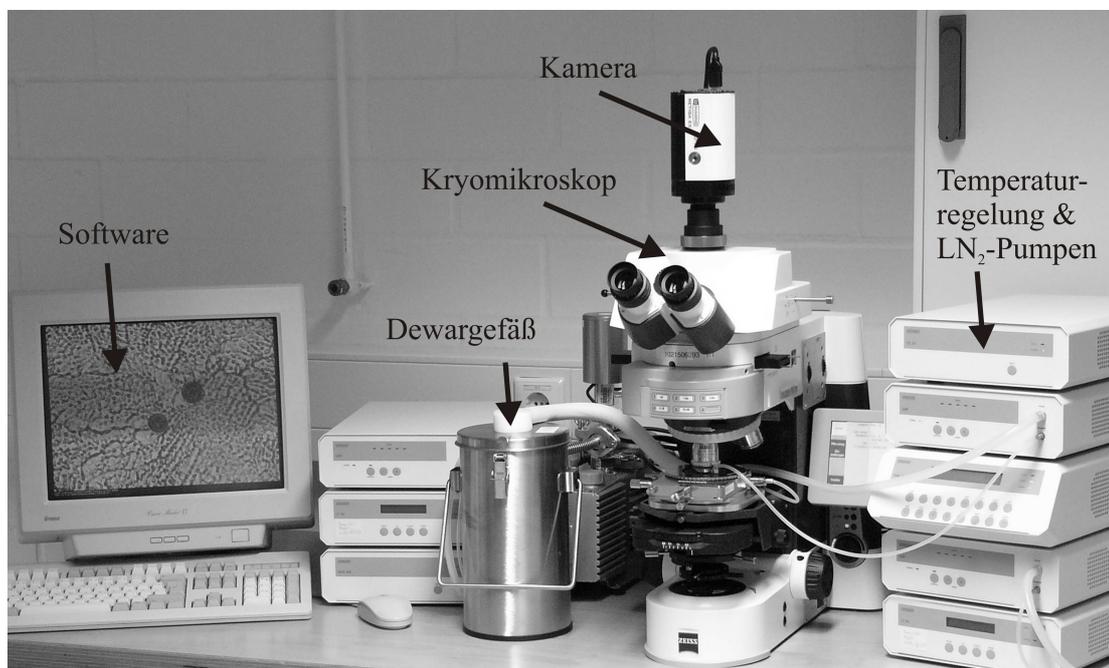


Abb. 5.1: Der Kryomikroskopie-Messplatz besteht aus dem Kryomikroskop (Zeiss Mikroskop Axio Imager mit der Linkam Frierkammer FDCS196), einer digitalen Videokamera (Retiga EXi Fast 1394, QImaging), Temperaturregelung und Flüssigstickstoff-Pumpen mit Dewargefäß und der Software Linksys32[®].

In diesem System wurde eine mikroskopische Probe konvektiv durch einen Massenstrom von Flüssigstickstoff gekühlt. Hierzu wurde von einem 2 L Dewargefäß Flüssigstickstoff (LN₂) über PTFE- und Silikonschläuche von einer Flüssigstickstoffpumpe angesaugt und strömte dabei durch einen Silberblock innerhalb einer Linkam Frierkammer FDCS196 (vgl. [Abb. 4.1](#)). Der dabei entstehende gasförmige Stickstoff wurde im System zur Erzeugung einer Schutzgasatmosphäre innerhalb der Frierkammer genutzt und verhinderte ein Beschlagen und Vereisen der optischen Komponenten. Durch gleichzeitiges Heizen des Silberblocks konnte aufgrund einer Temperaturregelung eine gewünschte Solltemperatur am Silberblock eingestellt werden. Über die Software Linksys32[®] konnten komplexe Temperaturprofile vom Anwender erstellt werden. Die Software erlaubte ebenfalls die Kontrolle der angeschlossenen digitalen Farbkamera. Mit einem 20fach Zeiss LD Plan-Neofluar „Long-Distance“-Objektiv mit einem Arbeitsabstand von 7,9 mm entstanden damit kryomikroskopische Bilder mit einer Auflösung von 1392 x 1040 Pixeln bei maximaler Bildwiederholungsfrequenz von 10 Bildern pro Sekunde. Die Probenvorbereitung von Zellen geschah in allen durchgeführten Experimenten nach einheitlichen Arbeitsabläufen und ist im Anhang in Abschnitt 10.2 detailliert beschrieben. Für die kryomikroskopischen Experimente wurde die Zellzahl manuell im Gesichtsfeld des Kryomikroskops eingestellt. Hierzu wurden 5 µL Zellsuspension mit einer definierten Konzentration an Frierschutzmittel auf einen auf 4°C vorgekühlten Quarzriegel pipettiert, der sich auf dem Silberblock innerhalb der Frierkammer befand. Nach Auflegen eines Abstandhalters und einem Deckglas mit 12 mm Durchmesser wurde die Frierkammer verschlossen und verhinderte damit das Austrocknen der Probe. Zur Bestimmung der intrazellulären Eiskristallbildung war für die statistische Auswertung eine hohe Zellzahl von bis zu circa 300 vereinzelt Zellen im Gesichtsfeld sinnvoll. Im Gegensatz dazu wurde für die Untersuchung des Zell-Volumens eine geringe Zellzahl von circa 20 vereinzelt Zellen im Gesichtsfeld gewählt, um eine manuelle oder automatisierte Bestimmung des Volumens zu ermöglichen. Hierbei wurden die Bildaufnahmen leicht außerhalb des Fokuses aufgenommen, was die automatische Bildauswertung zusätzlich vereinfachte, jedoch keinen Einfluss auf die Bestimmung des Zell-Volumens hatte. Das Temperaturprofil folgte in folgenden Schritten:

1. Beladen des Kryomikroskops mit Zellen bei 4°C für circa 5 min
2. Kühlen mit 1 K/min

3. *Wahlweise*: Halten bei -8°C , um eine aktive Nukleation der Probe mit einem vorgekühlten Kupferstab einzuleiten; anschließendes Erwärmen bis knapp unterhalb der Schmelztemperatur; weiteres Kühlen mit 1 K/min
4. Erwärmen von -60°C bis 4°C mit 100 K/min
5. Halten bei 4°C für 10 min

Standardmäßig wurde manuell das Schrumpfen und Schwellen von Zellen mit Hilfe der gemeinfreien Software ImageJ[®] ausgewertet. Ausgehend von einem zweidimensionalen Bild einer Zelle wurde zunächst deren Umfang markiert und daraus eine Fläche A bestimmt. Unter der vereinfachenden Annahme, dass eine HPMEC-Zelle in Suspension eine sphärische Geometrie besitzt, konnte hieraus auf das Volumen V geschlossen werden [1], mit

$$\frac{V}{V_0} = \left(\frac{A}{A_0} \right)^{3/2} \quad (5.1)$$

wobei sich der Index 0 auf isotonische Bedingungen bezieht. Bei der Untersuchung der intrazellulären Eiskristallbildung am Kryomikroskop wurden mit den HPMEC-Zellen nach dem Frier-Tau-Vorgang zusätzlich Vitalitätsmessungen am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, die im Anhang, Abschnitt 10.4, näher beschrieben werden.

5.1.2 Verbesserte Bilderfassung und -analyse

Um eine höhere temporale Auflösung der osmotischen Vorgänge zu erzielen, wurde an das Kryomikroskop eine Hochgeschwindigkeitskamera MotionPro X4 von Imaging Solutions adaptiert (Abb. 5.2). Hiermit wurden kryomikroskopische schwarz/weiß-Bilder mit einer Auflösung von 512×512 Pixeln bei einer Bildwiederholungsfrequenz von 1000 Bildern pro Sekunde erstellt. Die Bildaufnahme startete nach einer manuellen Triggerung der Kamera und die Bilddaten wurden in ihrem internen 4 GByte Flash-EEPROM gespeichert. Nach erfolgter Bildaufnahme wurden diese Bilddaten ausgelesen und analysiert. In dieser Arbeit wurden Bildaufnahmen von einer Hochgeschwindigkeitskamera genutzt, um die intrazelluläre Eiskristallbildung von humanen Endothelzellen (HPMEC) zu untersuchen. Die Probenvorbereitung und Frierbedingungen geschahen analog der im Anhang in Abschnitt 10.2 beziehungsweise in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Prozeduren. Speziell wurden hier die Frierbedingungen so gewählt, dass sie den optimalen Bedingungen hinsichtlich Kühlrate und

Konzentration an Me_2SO entsprachen, jedoch ohne Einleitung einer aktiven Nukleation. Die optimalen Bedingungen beim Einfrieren von HPMEC-Zellen waren aus eigenen Voruntersuchungen und bereits veröffentlichten Parameterstudien [24], [80], [149] bekannt: eine Kühlrate von 5 K/min und eine Me_2SO -Konzentration von 5 Vol.-%. Aufgrund einer hohen Anzahl an durchgeführten kryomikroskopischen Experimenten wurden bei der Analyse des Zell-Schrumpfens und -schwellens eine fortgeschrittene Methode der automatisierten Bildverarbeitung gewählt. Diese konnte in zwei Matlab[®]-Algorithmen in der Bildverarbeitung unterschieden werden, nämlich die *Zell-Detektion* und die *Zell-Verfolgung*. Beide Teile erlaubten eine automatisierte Analyse von Einzelbildern und Videos. Bei der *Zell-Detektion* wurde eine Hough-Transformation zur Kreis-Detektion mit variierendem Radius durchgeführt, woraus sich ein Hough-Tensor und ein Hough-Array ergab, deren Peaks mögliche Positionen von Zellen darstellten. Die *Zell-Verfolgung* geschah für jede Zelle separat über alle Einzelbilder und konnte in folgende drei Schritte zusammengefasst werden:

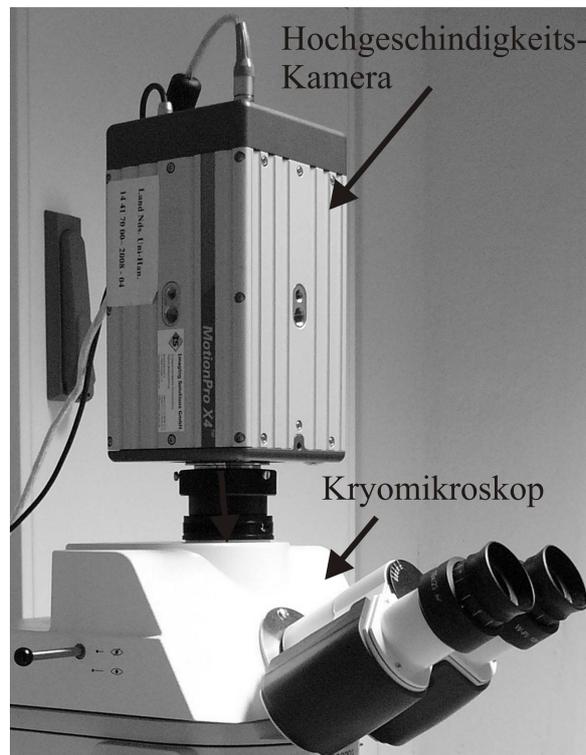


Abb. 5.2: Aufbau einer Hochgeschwindigkeitskamera MotionPro X4 von Imaging Solutions auf das Kryomikroskop. Alle weiteren optischen Komponenten des Kryomikroskops, insbesondere das Objektiv, blieben unverändert (vgl. [Abb. 5.1](#)). Die Bildwiederholungsfrequenz wurde auf 1000 fps per Software eingestellt.

Erstens, Glätten der Bilder durch eine anisotrope Diffusion [153]; zweitens, Bestimmung des Zell-Mittelpunkts durch Kanten-Detektion mittels Canny-Edge-Detektion und einer Hough-Transformation; drittens, Ausfüllen des Zellinneren durch „region growing“ [17]. Aus der Anzahl der Pixel im Zellinneren wurde aus Gleichung 5.1 das Zell-Volumen bestimmt (Abb. 5.3). Zur Validierung der automatisierten Bildverarbeitung mit dem Kryomikroskopie-System wurden Coulter Counter CCL10[®] Latex-Perlen von Beckmann mit Durchmessern von 5 μm und 20 μm und Glasperlen von LaVision mit Durchmessern von 11 μm bis 17 μm eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass diese automatisierte Bildverarbeitung eine hinreichend genaue Methode zu Bestimmung des osmotischen Verhaltens von HPMEC-Zellen bei tiefen Temperaturen war [186].

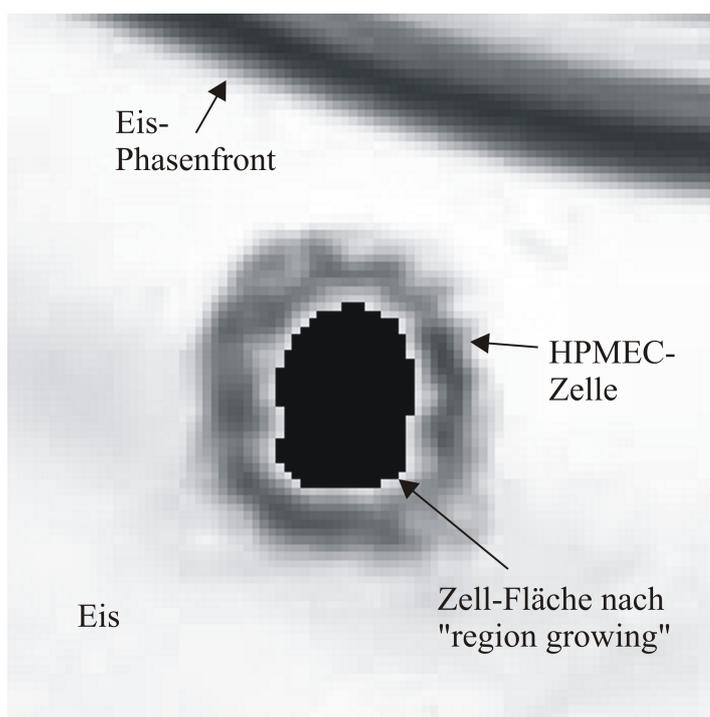


Abb. 5.3: Methode zur Bestimmung des Zell-Volumens von HPMEC-Zellen: Der innere Bereich einer Zelle wurde durch „region growing“ im Bild schwarz ausgefüllt [17], [52], woraus sich das Zell-Volumen unter Annahme einer sphärischen Geometrie berechnen ließ.

5.1.3 Konstruktion und Realisierung eines Nukleators

Zur Untersuchung des Einflusses der Nukleationstemperatur T_n auf das osmotische Verhalten von Zellen unter dem Kryomikroskop wurden an das Messsystem folgende Anforderungen gestellt:

- Gewährleistung einer kontinuierlichen Bildaufnahme während des Nukleationsvorganges
- Keine Beeinflussung der Schutzgasatmosphäre in der Frierkammer (vgl. [Abb. 4.1](#))
- Kontrolle der Nukleationstemperatur zwischen Schmelztemperatur und spontaner Nukleationstemperatur
- Automatisches Auslösen der Nukleation, sobald die gewünschte Nukleationstemperatur erreicht wurde
- Reproduzierbarkeit und Visualisierbarkeit der aktiven Nukleation und der Zellen

Diese System-Anforderungen waren mit herkömmlichen Methoden nicht erfüllbar [140]. Aus diesem Grund wurde hier ein System zur aktiven Nukleation, ein sogenannter Nukleator entwickelt, der an das Kryomikroskop angepasst war und die beschriebenen System-Anforderungen erfüllte. Das ausgewählte Prinzip des Nukleators basierte auf einem gekühlten Metallstab, der eine aktive Nukleation in einer unterkühlten wässrigen Probe auslöste. [Abb. 5.4](#) zeigt ein SolidWorks[®]-Modell eines Nukleators mit einer Frierkammer für die Kryomikroskopie. Dieses bestand aus einem Metallstab, der mittels eines linear geführten Schlittens, Spindel und Schrittmotor automatisiert verschieblich war. Die Spitze des Metallstabes wurde durch einen Flüssigstickstoff-durchströmten Wärmetauscher gekühlt und wurde mit einer Genauigkeit der Linearbewegung von 25 μm positioniert. Der Aufbau auf einer Rampe ermöglichte die exakte Winkel-Positionierung des Metallstabes zwischen Frierkammer und dem Objektiv des Kryomikroskops. Ein modifizierter Deckel der Frierkammer besaß eine schräge Öffnung zum Einführen des Metallstabes und musste deshalb während der Nukleation nicht abgenommen werden. Um zu bewerkstelligen, dass der Metallstab nicht unkontrolliert auf die Probe zufuhr und eventuell den Quarztiegel beschädigte, wurde seine Position mit Hilfe einer Kamera erkannt und der nötige Verfahrensweg zur Probe automatisch bestimmt. Die Ansteuerung des Schrittmotors, die Positionserkennung des Metallstabes mittels Kamera sowie die Triggerung des automatischen Nukleationsvorgangs wurden über

ein in Visual Basic[®] neu entwickeltes Programm kontrolliert, das im Anhang, Abschnitt 10.5 beschrieben ist.

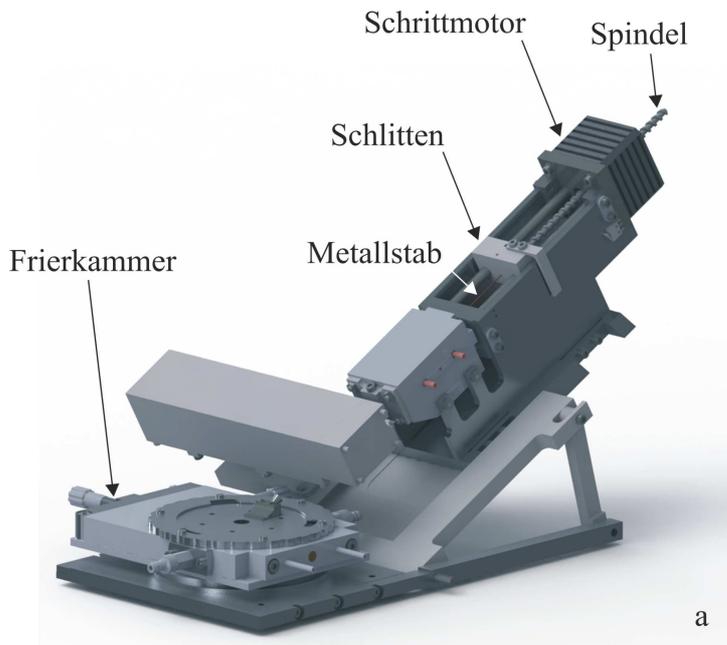
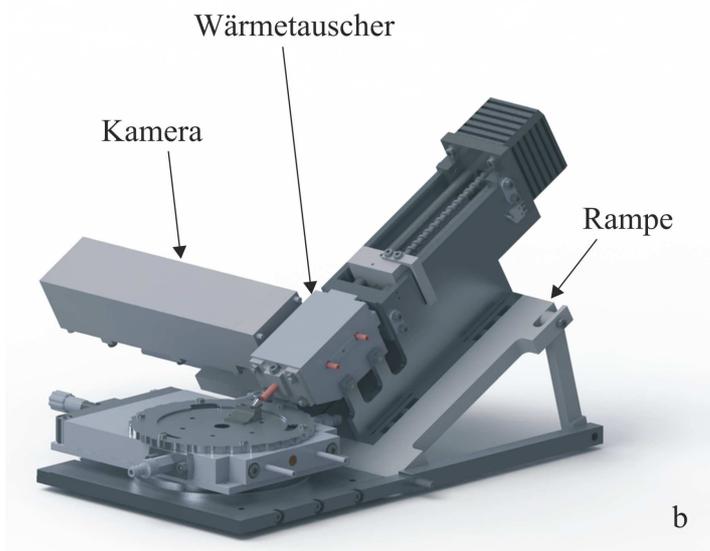


Abb. 5.4:

SolidWorks[®]-Modell eines Nukleators zur automatisierten Nukleation wässriger Lösungen unter dem Kryomikroskop. Während einer Kalibration wurde die Position der Spitze des Metallstabes automatisch von einer Kamera erkannt, woraus sich der Verfahrensweg computergesteuert errechnete (a). Erreichte die Temperatur des Silberblocks die von dem Programm eingestellte Solltemperatur, so wurde der Schlitten mit dem Metallstab nach vorheriger Kühlung zur wässrigen Probe innerhalb der Frierkammer automatisch zugeführt (b).



Der Aufbau des Nukleators am Kryomikroskop ist in [Abb. 5.5](#) dargestellt. Der Metallstab wurde mit einer sehr feinen Spitze versehen, um die Ortsauflösung der Nukleation im

Gesichtsfeld des Kryomikroskops zu verbessern. Hierzu wurde eine Anlage zum elektrochemischen Ätzen aufgebaut. Diese erlaubte die Herstellung von konisch geformten Spitzen aus 1 mm breiten Wolframdrähten, welche unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht wurden, siehe Anhang [Abb. 10.10](#) und [Abb. 10.11](#).

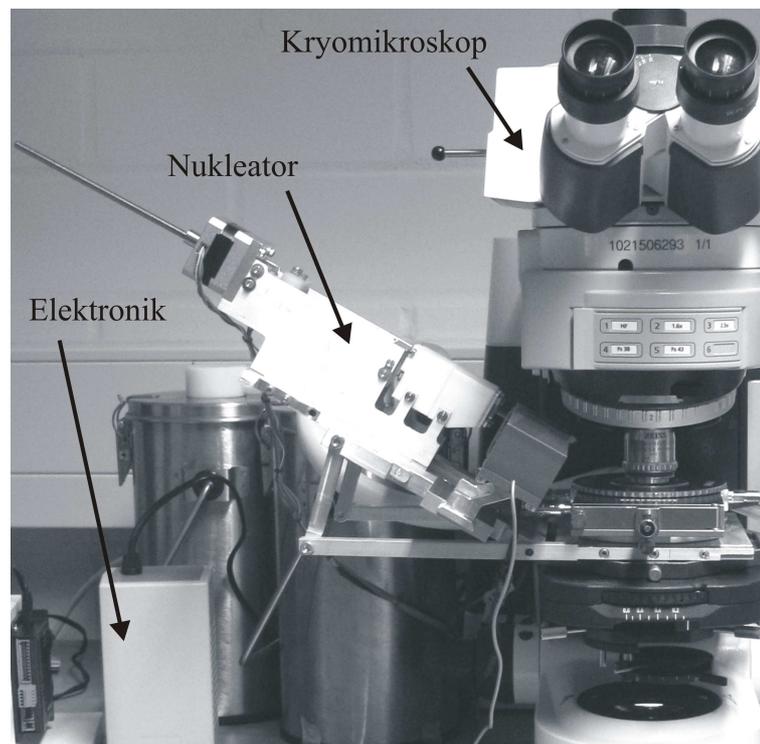


Abb. 5.5: Nukleator zur aktiven Kontrolle der Nukleation einer wässrigen Probe unter dem Kryomikroskop: Die Bedienung des Nukleators erfolgte über eine Software (vgl. [Abb. 10.8](#)), die mit Hilfe einer Temperatur- und Regelungselektronik (Elektronik) Daten des Schrittmotors und der Kamera auswertete.

5.1.4 Versuchsdurchführung Nukleator

Die Probenvorbereitung geschah analog der im Anhang in Abschnitt 10.2 beschriebenen Prozedur. Das Frierprotokoll wurde über die Linksys32[®]-Software festgelegt und war für die Erfassung der intrazellulären Eiskristallbildung angepasst:

1. Beladen des Kryomikroskops mit Zellen bei 4°C für circa 5 min
2. Kühlen mit 1 K/min bis -60°C mit automatischer Auslösung der Nukleation bei T_n

3. Erwärmen von -60°C bis 4°C mit 100 K/min
4. Entnahme der Zellen im Quarztiegel; Transport der Zellen auf $\sim 0^{\circ}\text{C}$; Durchführung von Vitalitätstests am Fluoreszenzmikroskop (Anhang, Abschnitt 10.4)

5.2 Zylinderförmige Zellsuspensionen

5.2.1 Coulter Counter-Technik

Zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens von HPMEC-Zellen unter verschiedenen Bedingungen wurde ein Beckman Multisizer 3[®] Coulter Counter verwendet (Abb. 5.6). Dieser detektierte Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit während des Durchströmens von HPMEC-Zellen durch eine $100\ \mu\text{m}$ große Apertur, woraus eine Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens ermittelt wurde. Ausgehend von einer Probenvorbereitung nach Anhang, Abschnitt 10.2 wurde eine $4\ \text{mL}$ Zellsuspension auf $2 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/mL in einem zylinderförmigen Probenbehälter eingestellt. Der Coulter Counter wurde zunächst mit $10\ \mu\text{m}$ großen CCL10 Latex Beads von Beckman mit den jeweils zu untersuchenden Osmolaritäten und Frierschutzmittelkonzentrationen kalibriert. Die Konzentration betrug dabei 2 bis 4 Tropfen Latex Beads in $20\ \text{mL}$ Lösung. Danach erfolgten die Messungen mit HPMEC-Zellen, wobei drei verschiedene Messmethoden durchgeführt wurden. Die erste Methode diente zur Bestimmung von Boyle Van't Hoff-Diagrammen. Hierzu wurden $20\ \mu\text{L}$ Zellsuspension in $20\ \text{mL}$ unterschiedlich konzentrierte NaCl- und PBS-Lösungen (vgl. Anhang 10.3.2) pipettiert und nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten resuspendiert und gemessen. Der Messvorgang wurde nach 20.000 gemessenen Partikeln automatisch beendet. Eine zweite Methode wurde genutzt, um den Einfluss unterschiedlicher Frierschutzmittelkonzentrationen an Me_2SO (1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 6 M) bei Raumtemperatur auf das Zell-Volumen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten von 10, 20, 30 und 40 Minuten zu bestimmen. Diese Messungen wurden mit $1 \cdot 10^6$ Zellen in $20\ \text{mL}$ Lösung durchgeführt. Die dritte Methode diente dem Vergleich der Volumen-Häufigkeitsverteilung von kryokonservierten mit nicht-kryokonservierten Zellsuspensionen mit 0 und $0,7\ \text{M}$ Me_2SO . Die

Kryokonservierung erfolgte im Einfriergerät CM2000 bei einer Kühlrate von 5 K/min ohne Kontrolle der Nukleationstemperatur.

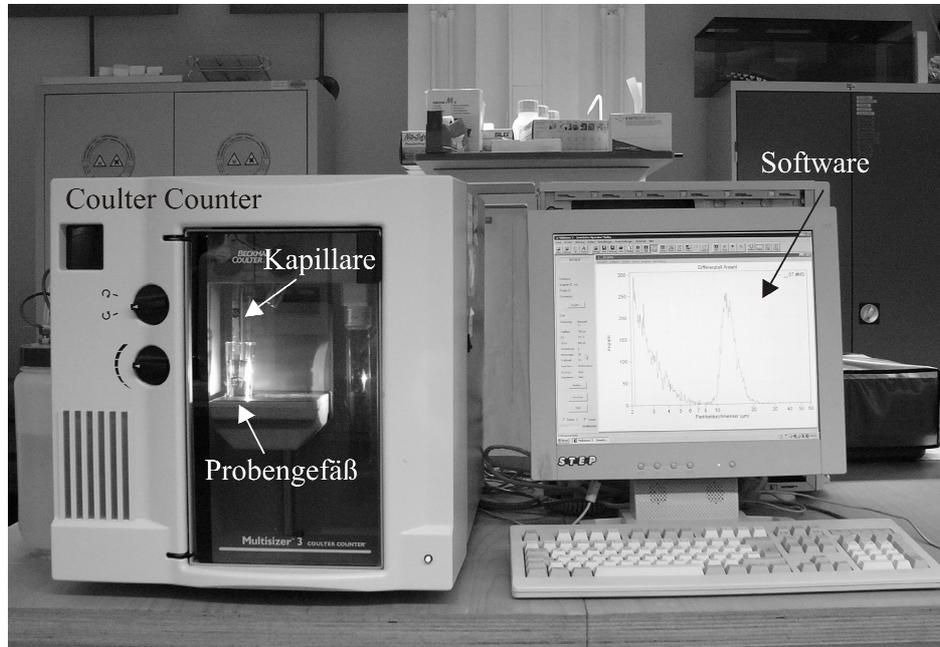


Abb. 5.6: Der Coulter Counter-Messplatz zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung von Partikeln.

5.2.2 Konstruktion und Realisierung eines Frierblocks

Zur Kontrolle der Nukleationstemperatur von Zellsuspensionen in kommerziell erhältlichen Kryoröhrchen wurde in dieser Arbeit ein Frierblock entwickelt. Dieser hatte die Aufgabe, acht parallel angeordnete Proben auf gleiche Temperatur zu bringen und bei einer vom Anwender vorgegebenen Temperatur zu nukleieren. Die Kühlung erfolgte dabei innerhalb des automatischen Einfriergerät (CM2000, Carbueros Metalicos, Spanien). Zur Kontrolle der Nukleationstemperatur wurde ein Prinzip gewählt, das anwenderfreundlich, zuverlässig und betriebssicher arbeitet. Außerdem sollte das System steril, autoklavierbar sein und bei tiefen Temperaturen im vereisten Zustand eine Probenentnahme ermöglichen. Die Wahl fiel auf die Auslösung einer indirekten Nukleation von wässrigen Proben basierend auf einem Prinzip mit Peltier-Elementen. „Indirekte Nukleation“ bedeutet hier, dass zuerst in einer Induktionslösung in einem separaten Reservoir außerhalb des Kryoröhrchens eine primäre Nukleation erfolgte,

die über ein PTFE-Röhrchen dann durch eine sekundäre Nukleation die Probe innerhalb des Kryoröhrchens nukleierte. Der Aufbau des für acht Proben entwickelten Frierblocks ist in [Abb. 5.7](#) in einer Explosionsansicht dargestellt. Eine Kammerleiste enthielt acht Reservoirs für die Induktionslösungen, die jeweils von einem Peltier-Element gekühlt werden konnten. Die bei der Kühlung an den Peltier-Elementen entstehende Wärme wurde an einem Kühlkörper nach außen abgeführt. Ein Reservoir war jeweils durch einen Drehstift verschließbar und ein zusätzlicher Deckel verhinderte eine spontane Nukleation. Ein Kryoröhrchen bildete mit einem Reservoir über einem IN-Stopper[®] und einem PTFE-Röhrchen eine zusammenhängende, verschließbare Einheit, die durch IN-Stopper[®], Kryoröhrchen-Leiste und Außenwände in Position gehalten wurde. Zwei Kühlkörper seitlich der Kryoröhrchen besaßen den Zweck einer homogenen Temperaturverteilung (vgl. Abschnitt 4.1.3). Die weiteren Komponenten des Systems wie Leitungskanal, Anschlussblock und Temperaturbuchsen dienten zur Führung der stromführenden Leitungen. Die Peltier-Elemente benötigen zusammen eine Stromversorgung von 19 A bei 1,9 V, die das GWinstek[®] PSM2010 Labornetzteil lieferte. Die Temperaturmessung mit Thermoelementen aus Kupfer/Konstantan (T-Typ) erfolgte im äußeren Kontakt eines jeden Kryoröhrchens und wurde über einen Temperatur-Logger Meilhaus RedLab[®] gemessen. Ein neu entwickeltes Matlab[®]-Programm, das im Anhang 10.5 näher beschrieben ist, nutzte die gemessenen Temperaturmesswerte und löste automatisch durch Ansteuerung der Peltier-Elemente bei der gewünschten Nukleationstemperatur eine Nukleation der acht Proben aus⁴. Der zusammengesetzte Frierblock ist in [Abb. 5.8](#) dargestellt.

5.2.3 Versuchsdurchführung Frierblock

Bei der Anwendung des Frierblocks zur Kontrolle der Nukleationstemperatur von Zellsuspensionen hatten sich folgende Arbeitsschritte bewährt: Zu Beginn wurde der Einfrierautomat CM2000 gestartet und mit dem gewünschten Frierprotokoll auf 4°C vorgekühlt. Über das Matlab[®]-Programm wurden die erforderlichen Eingabe-Parameter eingestellt, darunter eine Vorlaufzeit, eine Haltezeit, die Nukleationstemperatur T_n und eine maximal zulässige Abweichung von T_n .

⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Anmeldeverfahren zur Erlangung von Schutzrechten eingeleitet.

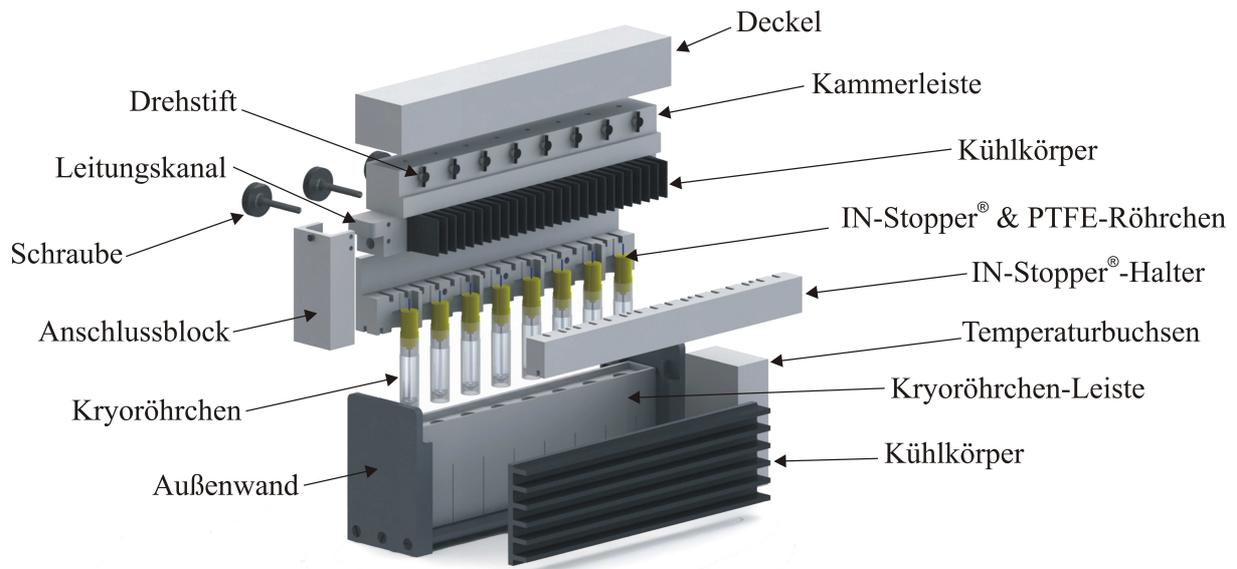


Abb. 5.7: Explosionsansicht des Peltier-Element-basierten Frierblocks, bestehend aus: 8 Drehstiften, 1 Leitungskanal, 3 Schrauben, 1 Anschlussblock, 8 Kryoröhrchen, 2 Außenwände, 2 Kühlkörper zur homogenen Abfuhr der Wärme von den Proben, 2 Kryoröhrchen-Leisten, 1 Halterung für 8 Temperaturbuchsen, 2 In-Stopper®-Halter, 8 In-Stopper® mit PTFE-Röhrchen, 1 Kühlkörper zur Abfuhr der Wärme von den Peltier-Elementen, 1 Kammerleiste und 1 Deckel zur Verhinderung der spontanen Nukleation.



Abb. 5.8: Peltier-Element-basierter Frierblock zur Nukleation von acht parallelen 1 mL Proben in Kryoröhrchen. Nicht dargestellt ist der Deckel für die Kammerleiste (vgl. Abb 5.7).

Im weiteren Schritt wurden die In-Stopper[®] mit PTFE-Röhrchen bestückt und mit der Kammerleiste verbunden. Nun wurden die Reservoirs und PTFE-Röhrchen mit Hilfe einer Spritze mit Injektionslösung gefüllt und mit den 1 mL Zellsuspension gefüllten Kryoröhrchen verbunden. Der Frierblock wurde zusammengesetzt, elektrisch verkabelt und in den vorgekühlten Einfrierautomaten gestellt (Abb. 5.9). Während des Einfrierens mit einer Kühlrate von 5 K/min wurden die Temperaturen der acht Proben graphisch überwacht. Der Nukleationsvorgang jeder Probe wurde durch einen Temperaturanstieg graphisch erkennbar. Die Temperaturdaten wurden schließlich im Excel[®]-Format gespeichert. Bei einer Temperatur von circa -100°C wurde der Einfriervorgang gestoppt und die Proben im gefrorenen Zustand entnommen und schließlich in einer Sanyo Tiefkühltruhe bei -150°C gelagert. Nach mehr als 24 Stunden Lagerung wurden die Proben in einem Wasserbad mit 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen in der Probe sichtbar war und dann auf Eis gestellt. Diese Vorgehensweise verhinderte einen Temperaturanstieg der Probe über 0°C. Die anschließende Messung der Membran-Integrität erfolgte gemäß Anhang, Abschnitt 10.4.

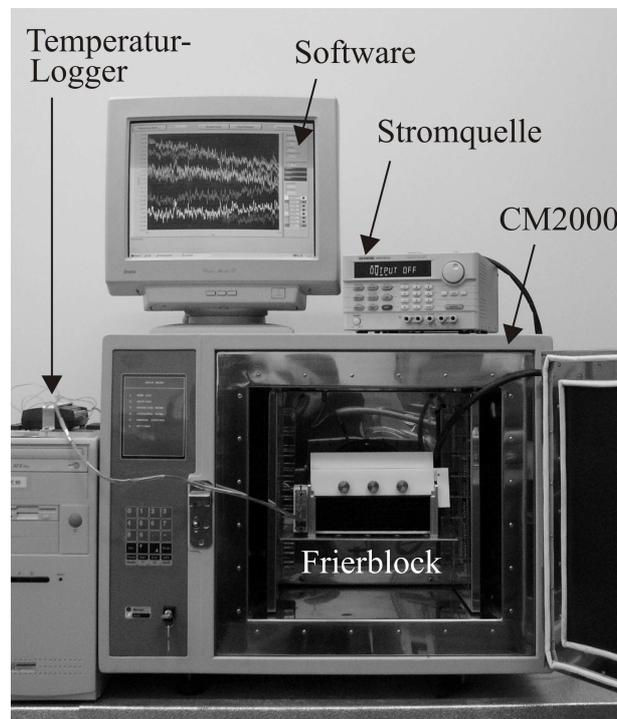


Abb. 5.9: Der CM2000-Messplatz mit Frierblock, Stromquelle, Temperatur-Logger und einem Programm zur Kontrolle der Nukleationstemperatur (LabVIEW[®]-Software, Anhang Abb. 10.9). Innerhalb des Friergerätes CM2000 konnte der Frierblock bis Temperaturen von -150°C kontrolliert abgekühlt werden. Die Nukleation der bis zu 8 Proben innerhalb des Frierblocks erfolgte automatisch bei einer vom Anwender vorgegebenen Temperatur.

5.3 Dünnschichtige Zellpellets

5.3.1 Fourier-Transform Infrarotspektroskopie von 10°C bis 90°C

Infrarotspektren wurden in dieser Arbeit mit einem Perkin Elmer 100 FTIR-Spektrometer (Perkin Elmer, Beaconsfield, Großbritannien) mit einem flüssigstickstoffgekühlten Quecksilber/Cadmium/Tellurid-Detektor (MCT) generiert (Abb. 5.10). Die Infrarotspektren wurden mit einer 4 cm^{-1} Auflösung im Wellenzahlenbereich von 900 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} aufgenommen und es erfolgte eine Mittelwertbildung von 8 Interferogrammen. Die Temperatur wurde durch eine automatische Temperaturregelung (ATC) (Harrick Scientific, Pleasantville, New York), eingestellt. Hiermit wurde die Proben temperatur von 10°C bis 90°C bei einer Heizrate von 1 K/min erreicht. Der Temperaturverlauf wurde mit Thermoelementen und einem externen digitalen Fluke 53 II[®] Thermometer (Fluke, Everett, USA) aufgenommen.

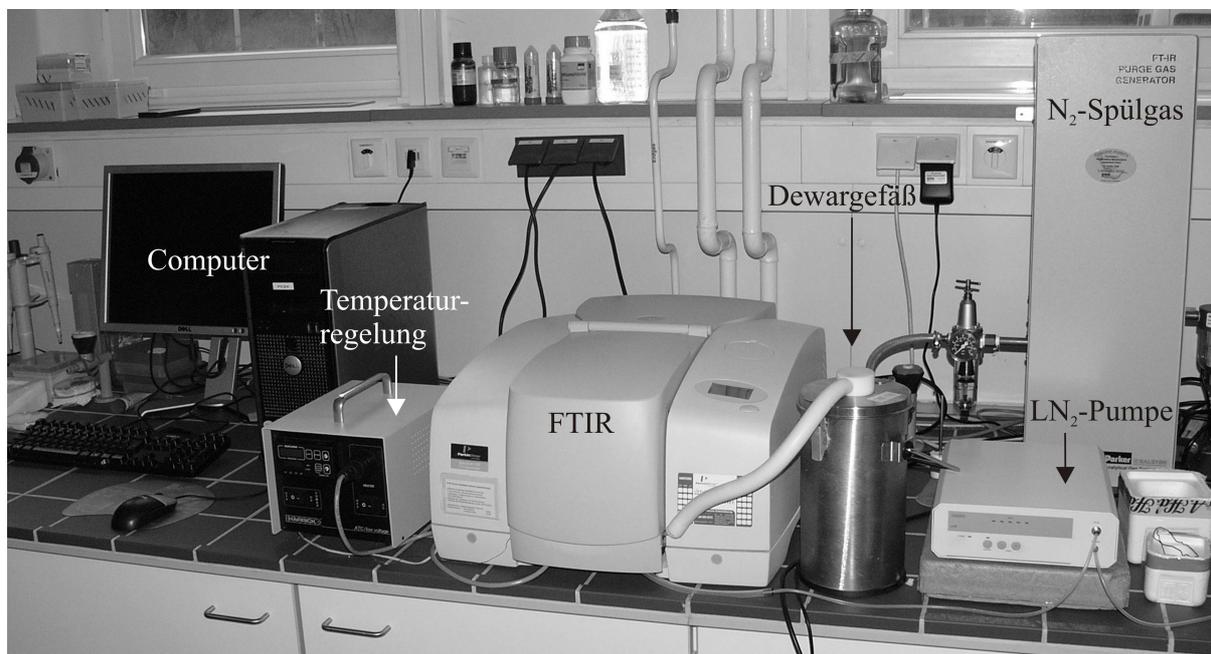


Abb. 5.10: Messaufbau des Fourier-Transform Infrarotspektrometers (FTIR) mit Flüssigstickstoff-Pumpe, Flüssigstickstoff-Dewargefäß, Temperaturregelung, N₂-Spülgas und einem Computer für die Auswertung der gemessenen Infrarotspektren.

Das System bestand zusätzlich aus einem Dewargefäß mit Flüssigstickstoff, der mittels einer Linkam LN₂-Pumpe (Linkam, Großbritannien) den FTIR-Probenhalter kühlte (vgl. Abschnitt 4.1.4). N₂-Spülgas verdrängte das sich im Strahlengang des FTIR-Spektrometers befindliche atmosphärische H₂O, das sich im Strahlengang aufgrund von Signal-Überlagerungen störend auf die Messung der Infrarotspektren ausgewirkt hätte.

Die Spektren wurden mit der Perkin Elmer Software OMNIC[®] (Perkin Elmer, Beaconsfield, Großbritannien) analysiert: Änderungen der Membran-Konformation wurden durch Verfolgung der Position des symmetrischen CH₂-Streckschwingungs-Bands (ν CH₂, Lipid-Band) bei $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ untersucht [28]. Die zweite Ableitung der Spektren wurde mit einem 13-Punkte Glättungsfaktor gebildet [208]. Um Membran-Phasenumwandlungen zu bestimmen, wurden daraus Diagramme erstellt, die die Abhängigkeit der Wellenzahl (ν CH₂) von der Temperatur darstellen. Die Protein Denaturierung, gekennzeichnet durch eine Konformationsänderung von einer α -Helix zum β -Faltblatt [28], wurde im Wellenzahlenbereich von 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} dem C=O-Schwingungs-Band der Peptidgruppe (Amid-I-Band) bestimmt. Daraus wurde die invertierte zweite Ableitung der Spektren mit einem 13-Punkte-Glättungsfaktor berechnet. Um einen Vergleich unterschiedlicher Proben durchführen zu können, wurde die Fläche im Amid-I-Band von 1610 cm^{-1} bis 1630 cm^{-1} auf die Fläche des Lipid-Bandes normiert.

5.3.2 Fourier Transform Infrarotspektroskopie von 10°C bis -45°C

Die Probenvorbereitung geschah bei der FTIR-Messung bei tiefen Temperaturen von 10°C bis -45°C analog zu der Vorbereitung bei hohen Temperaturen entsprechend Anhang, Abschnitt 10.2 (vgl. Abschnitt 5.3.1). Im weiteren Arbeitsschritt geschah die Beladung der CaF-Fenster mit einem 5 μ L Zellpellet auf einem $\sim 4^\circ\text{C}$ gekühlten Kühlkörper auf Eis. Der Messaufbau nach [Abb. 5.10](#) ermöglichte FTIR-Untersuchungen von dünnschichtigen Proben und einer konstanten Kühlrate von 1 K/min und Temperaturen von 4°C bis -45°C. Zu diesem Zweck wurde die Endtemperatur der Temperaturregelung auf -60°C eingestellt, um damit Nichtlinearitäten der Kühlrate bei tiefen Temperaturen zu vermeiden. Die Analyse der Infrarotspektren bei tiefen Temperaturen war mit der bei hohen Temperaturen vergleichbar.

5.3.3 Kryomikroskopie mit Zellpellets

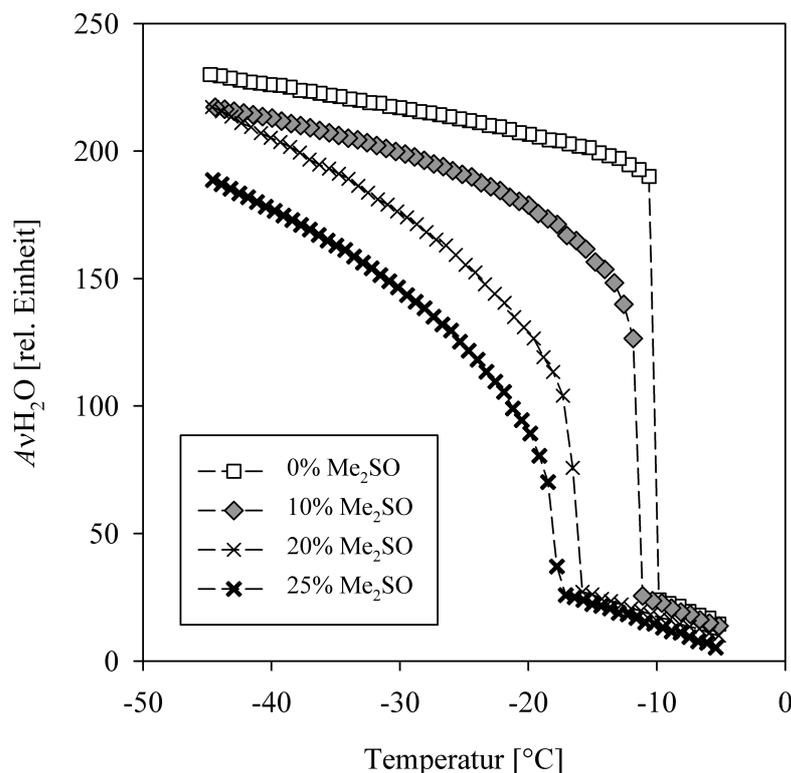
Die Probenvorbereitung von Zellpellets entsprach der Vorbereitung von Zellsuspensionen, jedoch war deren Handhabung unterschiedlich. Zunächst entfiel der Arbeitsschritt der Zell-Resuspendierung. Bei der Beladung von Zellpellets auf den 4°C vorgekühlten Quarztiegel wurde die Probenmenge so dosiert, dass ein zusammenhängendes Monolayer an Zellen im Gesichtsfeld des Kryomikroskops sichtbar war. Da hierbei nur sehr wenig extrazelluläres Wasser vorhanden war, wurde die Probe zügig von einem Deckglas und dem Deckel der Kühlkammer verschlossen, um sie vor Austrocknung zu schützen. So wurde ebenfalls das Adhärenzverhalten der Zellen auf den Quarztiegel verhindert. Aufgrund der hohen Zelldichte und des damit verbundenen hohen Zell-Zell-Kontakts in Zellpellets war die Methode zur automatischen Bildanalyse des Zell-Volumens (vgl. Abschnitt 5.1.2) nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurde hier die Kryomikroskopie mit Zellpellets nur im Hinblick auf intrazelluläre Eiskristallbildung untersucht.

6 ERGEBNISSE

6.1 Effekte auf die Eiskristallbildung

6.1.1 Eiskristallbildung im H₂O-Band

Die Effekte der Konzentration an Frierschutzmittel auf die Eiskristallbildung wurden mit Hilfe der Fourier-Transform Infrarotspektren im H₂O-Band nachgewiesen. Abb. 6.1 stellt die Fläche des H₂O-Bandes in Abhängigkeit der Temperatur beim Kühlen von -4°C bis -45°C mit unterschiedlich konzentrierten Me₂SO-H₂O-Lösungen in Abwesenheit von Zellen dar.



Hier zeigt sich, dass die Phasenumwandlung von flüssig nach fest bei anfänglich geringeren Me_2SO -Konzentrationen abrupter erfolgte. Das heißt, bei gegebener Temperatur ist nach der Nukleation der Eisanteil bei höheren Me_2SO -Konzentrationen geringer.

6.1.2 Extrazelluläre Eiskristallbildung ohne intrazelluläre Eiskristallbildung

Die Kryomikroskopie wurde eingesetzt, um den Einfluss der Nukleationstemperatur auf die extrazelluläre Eiskristallbildung und der Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärem Eis zu dokumentieren. In den hier untersuchten Frierexperimenten erfolgte beim Kühlen von Zellsuspensionen auf -60°C grundsätzlich zunächst eine extrazelluläre Eiskristallbildung. Eine eventuell eintretende intrazelluläre Eiskristallbildung erfolgte hingegen nur als Folge einer extrazellulären Eiskristallbildung mit einer variierenden zeitlichen Verzögerung. Voraussetzung für eine intrazelluläre Eiskristallbildung war die mikroskopisch sichtbare Nähe der Eiskristallfront zu der Plasmamembran. Bei den Frierexperimenten mit HPMEC-Zell-Pellets konnte die extrazelluläre Eiskristallbildung nur bei hohen Nukleationstemperaturen nachgewiesen werden. Beim langsamen Einfrieren mit 1 K/min führten hohe Nukleationstemperaturen, wie beispielsweise bei -4°C , zu einem langsamen Eiskristallwachstum. Als Folge wurden Zellen in die sich aufkonzentrierten Bereiche verschoben. [Abb. 6.2](#) zeigt ein HPMEC-Zell-Pellet bei 4°C (a) bei $-0,9^\circ\text{C}$ und bei $-22,1^\circ\text{C}$ (c). Das in diesen Bildern wachsende extrazelluläre Eis verdrängt die Zellen in die sich aufkonzentrierenden Zwischenräume.

6.1.3 Extrazelluläre Eiskristallbildung mit intrazellulärer Eiskristallbildung

Mit Hilfe der Kryomikroskopie wurde die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung *PIF* von HPMEC-Zellen in Suspension bestimmt, um das unterschiedliche Nukleationsverhalten zwischen einer spontanen und einer aktiv kontrollierten Nukleation bei -8°C in Abwesenheit von Frierschutzmittel zu untersuchen. Hierbei trat nach der extrazellulären Eiskristallbildung die intrazelluläre Eiskristallbildung vor allem bei höheren Kühlraten von $\sim 20\text{ K/min}$ auf, was durch eine intrazelluläre Verdunklung (engl. darkening) nachweisbar war.

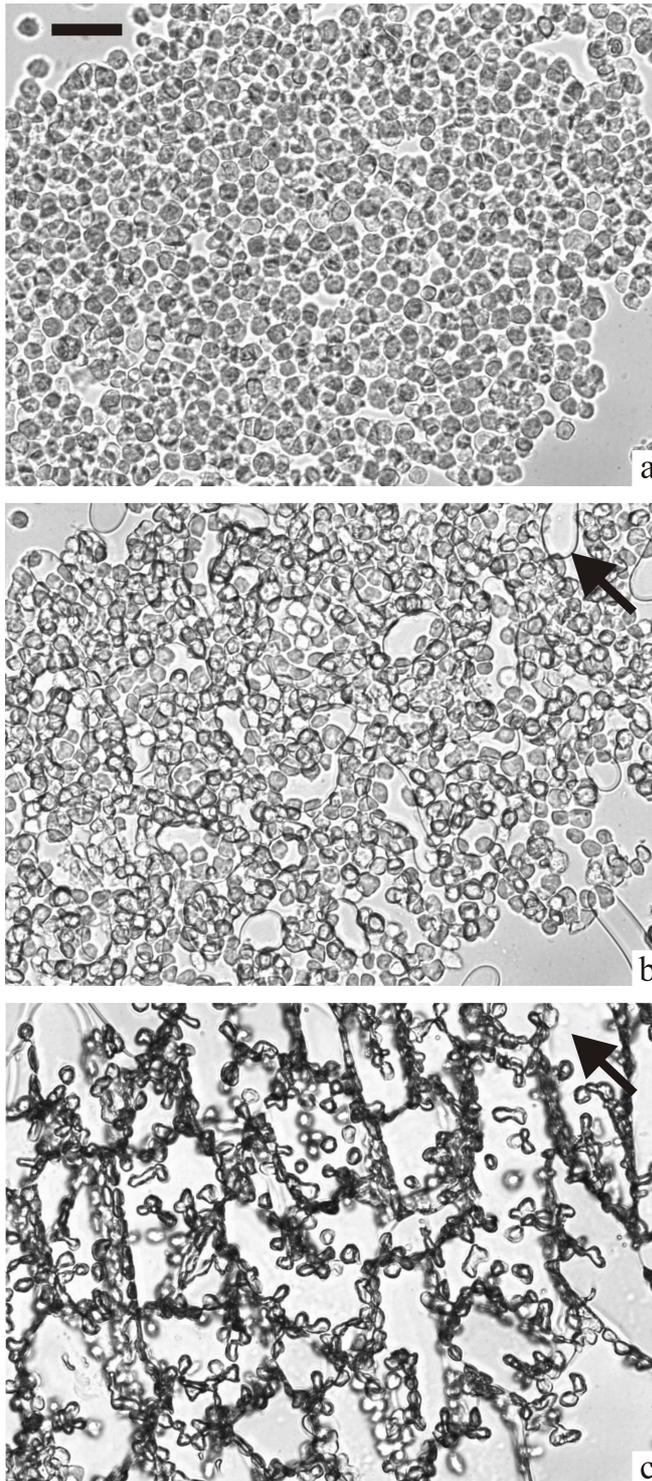


Abb. 6.2:

Kryomikroskopische Bildaufnahmen beim Einfrieren von HPMEC-Zell-Pellets ohne Zusatz von Frierschutzmitteln bei einer Kühlrate von 1 K/min. Bei 4°C liegen die Zellen meist dicht beieinander (a). Nach einer aktiven Nukleation bei -4°C und einer Erwärmung knapp unterhalb der Schmelztemperatur wachsen bei der weiteren Abkühlung vereinzelte Eiskristalle und drücken dabei die Zellen in die sich aufkonzentrierende Schmelze bei -0,9°C (b). Beim weiteren Abkühlen werden die Zellen zwischen die Eiskristalle gedrückt, wie hier bei -22,1°C dargestellt (c). Aufgrund des Seedings erfahren die Zellen keine intrazelluläre Eiskristallbildung. Außerdem ist ersichtlich, dass die Zellen in den aufkonzentrierten Bereichen geschrumpft sind (c). Die schwarzen Pfeile zeigen auf Bereiche kristallinen Eises. Der Maßstab in allen Bildern beträgt 50 µm (a).

Die kryomikroskopischen Untersuchungen mit 1 K/min und 5 K/min zeigten insbesondere in Abwesenheit von Frierschutzmitteln eine vergleichsweise niedrig Anzahl an intrazellulär nukleierten Zellen. Abb. 6.3 zeigt die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung beim Kühlen mit 20 K/min nach spontaner extrazellulärer Nukleation ($n = 3$). Daraus ist ersichtlich, dass die Zellen innerhalb eines Temperaturbereichs zwischen -14,9°C und -20,9°C intrazellulär nukleierten. Vergleichbare Ergebnisse unter aktiver Nukleation von -8°C

zeigen einen größeren Temperaturbereich der intrazellulären Nukleation zwischen $-9,0^{\circ}\text{C}$ und $-27,9^{\circ}\text{C}$ (Abb. 6.4). Durch die aktive Nukleation konnte die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung von 100% auf 71,5% verringert werden (Abb. 6.3, Abb. 6.4).

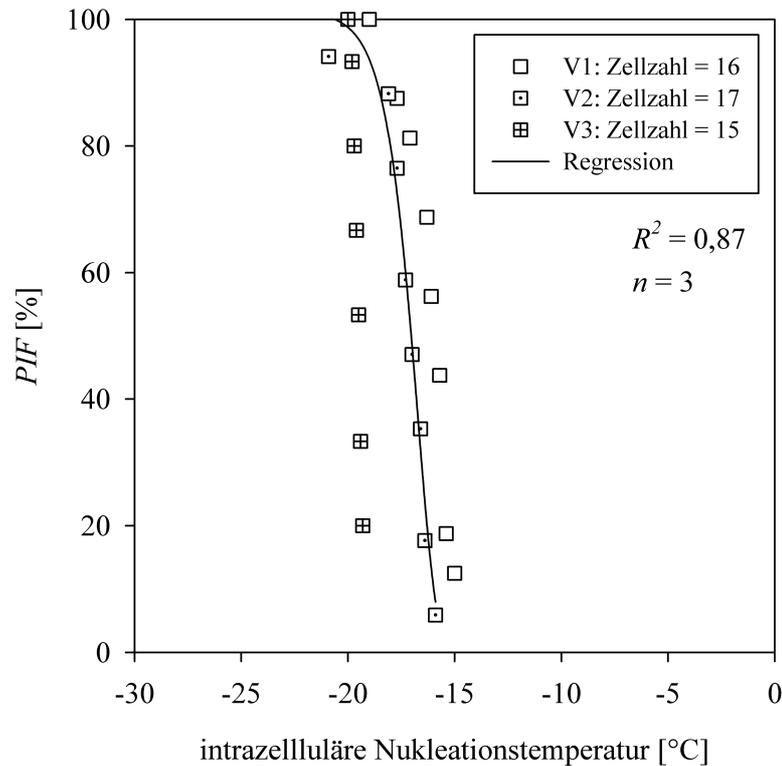


Abb. 6.3: *PIF* beim Kühlen von HPMEC-Zellen mit 20 K/min, ohne Frierschutzmittel und ohne aktive Nukleation. Die Ereignisse nach der intrazellulären Eiskristallbildung (engl. darkening) einzelner Zellen sind kumulativ dargestellt, analog zur Darstellung von Acharya et al [1]. Drei Messungen (Versuch V1, V2 und V3) wurden durchgeführt und eine Regression ergab ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,87$ (vgl. Gleichung 3.33).

In Tab. 6.1 sind die Ergebnisse der Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung *PIF* beim Kühlen von HPMEC-Zellen mit 5 K/min aufgelistet. Daraus ist ersichtlich, dass sich durch die aktive Nukleation bei $T_n = -8^{\circ}\text{C}$ die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung gegenüber einer spontanen Nukleation verkleinerte (mit 0 M und mit 1 M Me_2SO). Ein hoher Wert von $PIF = 46,0 \pm 19,9\%$ wurde bei spontaner Nukleation und 1 M Me_2SO ($\sim 7,1\%$ Me_2SO) gemessen, welcher in der Nähe des optimalen Frierprotokolls liegt ($B_{opt} = 5$ K/min, $C_{opt} = 5\%$ Me_2SO).

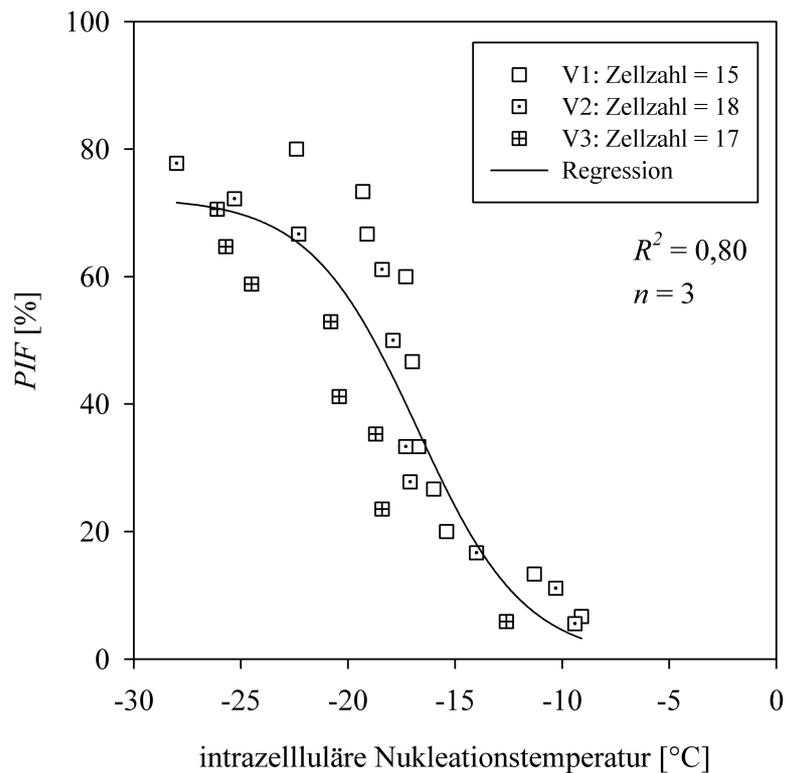


Abb. 6.4: *PIF* beim Kühlen von HPMEC-Zellen mit 20 K/min in Abwesenheit von Frierschutzmitteln, jedoch nach aktiver Nukleation bei -8°C (vgl. [Abb. 6.3](#)). Eine Regression ergab ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,80$ (vgl. Gleichung 3.33).

Tab. 6.1: Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung *PIF* beim Kühlen von HPMEC-Zellen mit 5 K/min mit 0 M und 1 M Me_2SO bei spontaner und aktiver Nukleation bei -8°C ($n = 3$): Angegeben ist die jeweilige Zellzahl, die extrazelluläre Nukleationstemperatur T_n sowie die gemittelte Nukleationstemperatur der intrazellulären Eiskristallbildung T_{IF} .

| | 0 M Me_2SO | 1 M Me_2SO |
|---------------------|--|--|
| spontane Nukleation | Zellzahl: 65 $T_n = -18,0 \pm 3,8^{\circ}\text{C}$ $T_{IF} = -19,4 \pm 3,4^{\circ}\text{C}$ $PIF = 50,9 \pm 25,9\%$ | Zellzahl: 51 $T_n = -19,2 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ $T_{IF} = -20,1 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ $PIF = 46,0 \pm 19,9\%$ |
| aktive Nukleation | Zellzahl: 39 $T_n = -8,0^{\circ}\text{C}$ $T_{IF} = -9,1 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ $PIF = 24,3 \pm 10,7\%$ | Zellzahl: 49 $T_n = -8,0^{\circ}\text{C}$ $T_{IF} = -9,9 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ $PIF = 12,8 \pm 5,1\%$ |

HPMEC-Zell-Pellets, bei denen in kryomikroskopischen Experimenten keine aktive Nukleation durchgeführt wurden, nukleierten spontan. Hierbei konnte die extrazelluläre Eiskristallbildung nicht visualisiert werden, da der enge Zell-Zell Kontakt das extrazelluläre Wasser verdrängte. Abb. 6.5 veranschaulicht dies an kryomikroskopischen Bildaufnahmen von HPMEC-Zell-Pellets mit 5% Me₂SO beim Einfrieren mit 1 K/min.

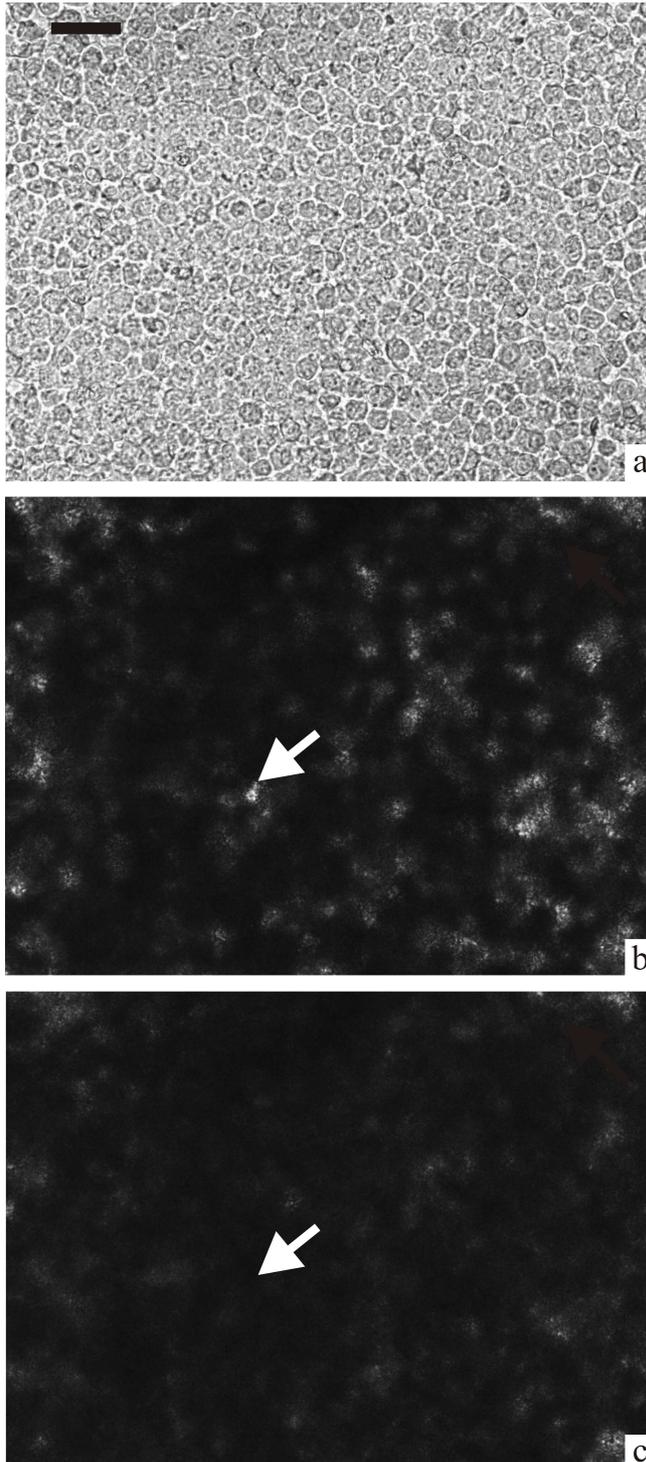


Abb. 6.5:

Kryomikroskopische Bildaufnahmen beim Einfrieren von HPMEC-Zell-Pellets mit 5% Me₂SO bei einer Kühlrate von 1 K/min vor der Nukleation bei -15,4°C (a). Die spontane Nukleation erfolgte ebenfalls bei -15,4°C, gefolgt von einem hohen Anteil intrazellulärer Eiskristallbildung, die durch die Verdunklung sichtbar wird (b). Eine weitere Verdunkelung der Aufnahme weist auf einen ansteigenden Zell-Anteil mit intrazellulärem Eis bei -15,5°C hin (c). Die weißen Pfeile zeigen auf einen Bereich, der sich verdunkelt (b,c). Der Maßstab in allen Bildern beträgt 50 µm (a).

Im unterkühlten Zustand liegen die Zellen bei $-15,4^{\circ}\text{C}$ in einem Quasi-Monolayer (a). Eine folgende Verdunkelung trat ohne eine sichtbare Phasenfront auf (b,c), da die intrazelluläre Eiskristallbildung der Zellen im Pellet spontan und örtlich verteilt erfolgte (b,c). Der Vorgang der extrazellulären und intrazellulären Eiskristallbildung konnte mit Hilfe des in Abschnitt 5.1.1 aufgebauten Kryomikroskopie-Aufbaus zeitlich nicht aufgelöst werden. Aus diesem Grund wurden die HPMEC-Zellsuspensionen in weiteren Experimenten mit einer Hochgeschwindigkeitskamera während des Einfriervorganges mit 1000 fps aufgenommen. Abb. 6.6

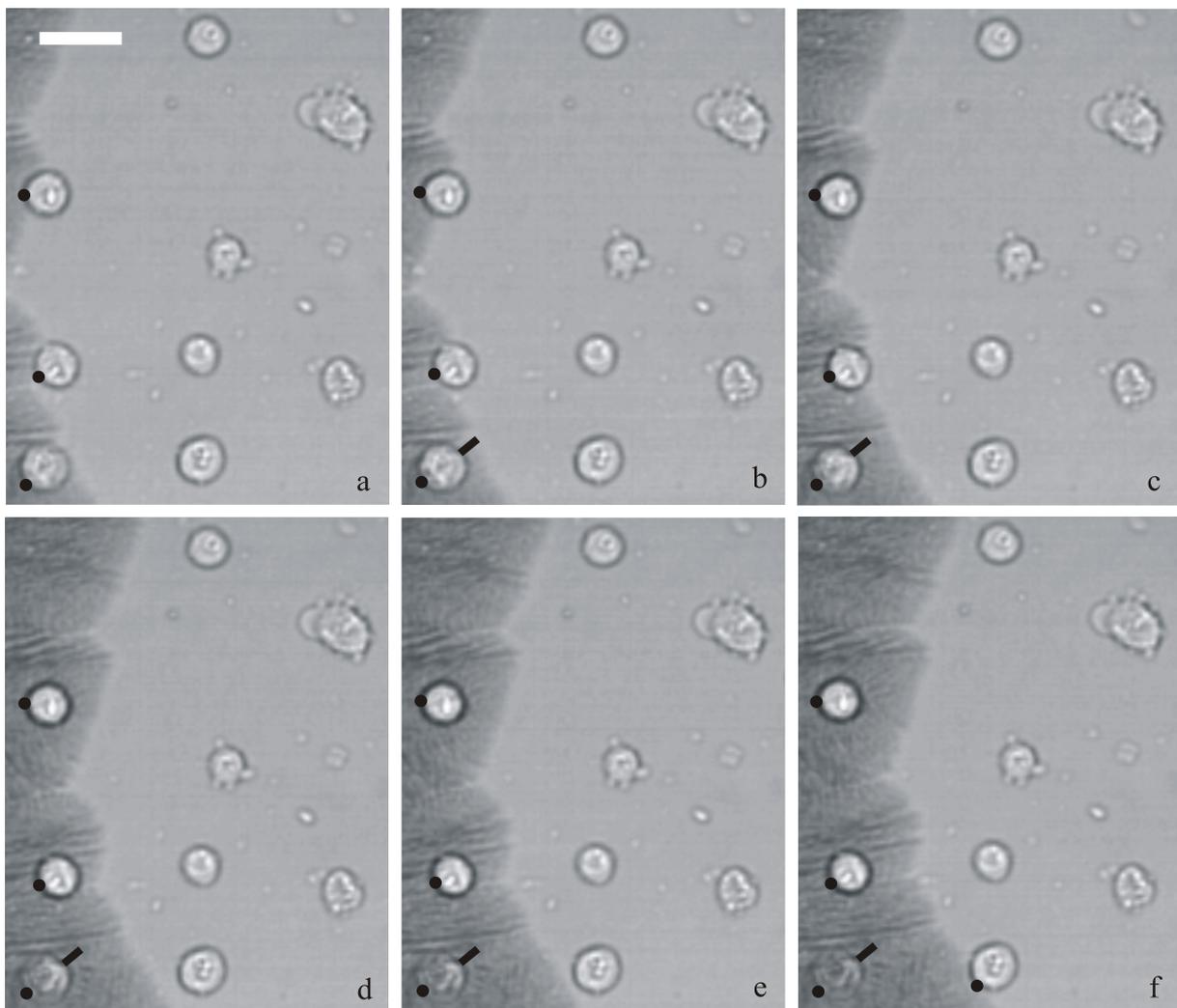


Abb. 6.6: Kryomikroskopische Bilder von HPMEC-Zellen, aufgenommen mit einer Hochgeschwindigkeitskamera mit 1000 fps: Die Nukleation erfolgte spontan bei $-16,1^{\circ}\text{C}$. Jeweils links in den Bildern erscheint die extrazelluläre Eiskristallfront mit der Geschwindigkeit der Phasenfront von $\sim 35\text{ mm/s}$ (a-f). Der Erstkontakt der Zellen mit extrazellulärem Eis ist mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Der Verlauf der intrazellulären Eiskristallbildung (IIF) lässt sich in der Zelle, die sich in den Bildern jeweils links unten befindet, durch eine Verdunkelung beobachten. Die Richtung der IIF ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet (b-f). Die Zellen wurden in 5% Me_2SO bei einer Kühlrate von 5 K/min aufgenommen. Der Maßstab beträgt $30\ \mu\text{m}$ (a).

Veranschaulicht die extrazelluläre und intrazelluläre Eiskristallbildung einer HPMEC-Zellsuspension mit 5% Me₂SO beim Einfrieren mit 5 K/min. Eine Eiskristallfront wanderte dabei nach spontaner Nukleation vom linken Bildrand nach rechts (a-f). Der Erstkontakt des extrazellulären Eises mit den Zellen wurde in den Bildern mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Außerdem wurde die Richtung einer eventuell auftretenden intrazellulären Eiskristallbildung (IIF) mit einem schwarzen Balken markiert. Im Allgemeinen war die Richtung der intrazellulären Eiskristallbildung nicht gleich der Richtung der extrazellulären Eiskristallbildung (EIF). Deshalb wurde hier ein Winkel α definiert, der zwischen dem Ort des Erstkontaktes EIF mit der Zellmembran und der IIF-Richtung liegt (eingebettete Skizze in Abb. 6.7). Dieser Winkel lieferte einen Hinweis darauf, ob der Ort des Erstkontaktes des extrazellulären Eises an der Zellmembran einen Einfluss auf den Ort der intrazellulären Nukleation hat.

Das Diagramm in Abb. 6.7 stellt die Anzahl der Zellen mit IIF als Funktion des Winkels α dar ($n = 6$).

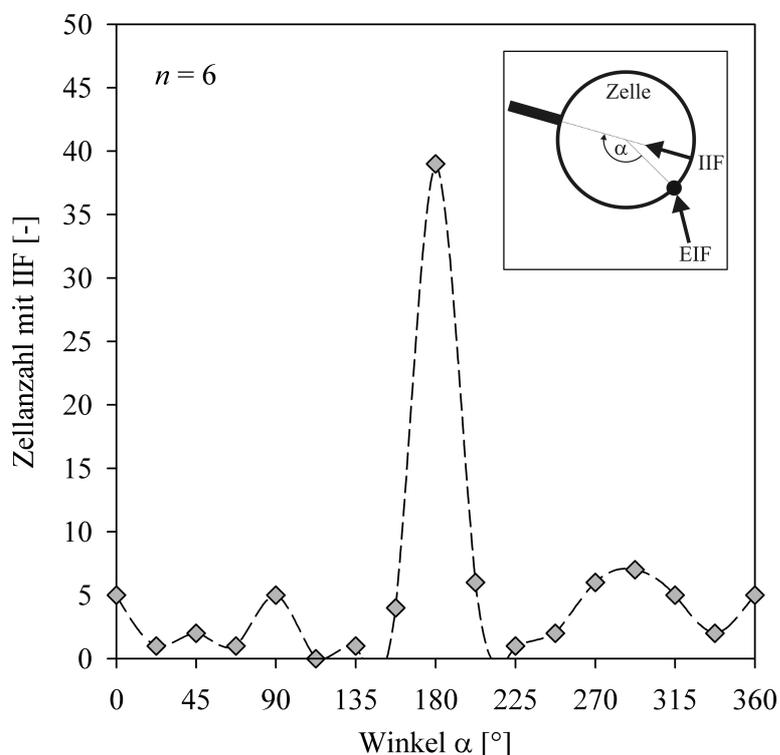


Abb. 6.7:

Richtungsabhängigkeit der intrazellulären Eiskristallbildung (IIF) von dem Erstkontakt der Zelle mit Eis durch extrazelluläre Eiskristallbildung (EIF). Die Definition des Winkels α ist im Diagramm anhand einer schematischen Zelle in einem Schaubild dargestellt (Ein schwarzer Punkt kennzeichnet den Erstkontakt der Zelle mit EIF und ein schwarzer Balken liegt in Richtung von IIF). Bei $\alpha = 180^\circ$ führt der Erstkontakt der Zelle mit extrazellulärem Eis an dieser Stelle zu einer intrazellulären Nukleation. Das Diagramm zeigt in kumulativer Darstellung, dass die meisten HPMEC-Zellen mit IIF bei dem Winkel $\alpha = 180^\circ$ intrazellulär nukleiert wurden ($p < 0,008$; t-Test $n = 6$).

Es existiert ein Maximum der IIF-Zellanzahl bei $\alpha = 180^\circ$, wobei dort der Ort des Erstkontaktes EIF mit der Zellmembran und der Ort der intrazellulären Nukleation beisammen lag. Zellen wurden ebenfalls bei Winkeln $\alpha \neq 180^\circ$ intrazellulär nukleiert, jedoch trat eine Nukleation bei $\alpha = 180^\circ$ signifikant häufiger auf ($p < 0,008$). Grundsätzlich erfolgte in den projizierten mikroskopischen Flächen der HPMEC-Zellen eine intrazelluläre Eiskristallbildung immer zunächst am Rand einer Zelle und wuchs dann komplett durch die Zelle. Im Gegensatz dazu wurde der Beginn der Eiskristallbildung im Zellinneren nicht festgestellt.

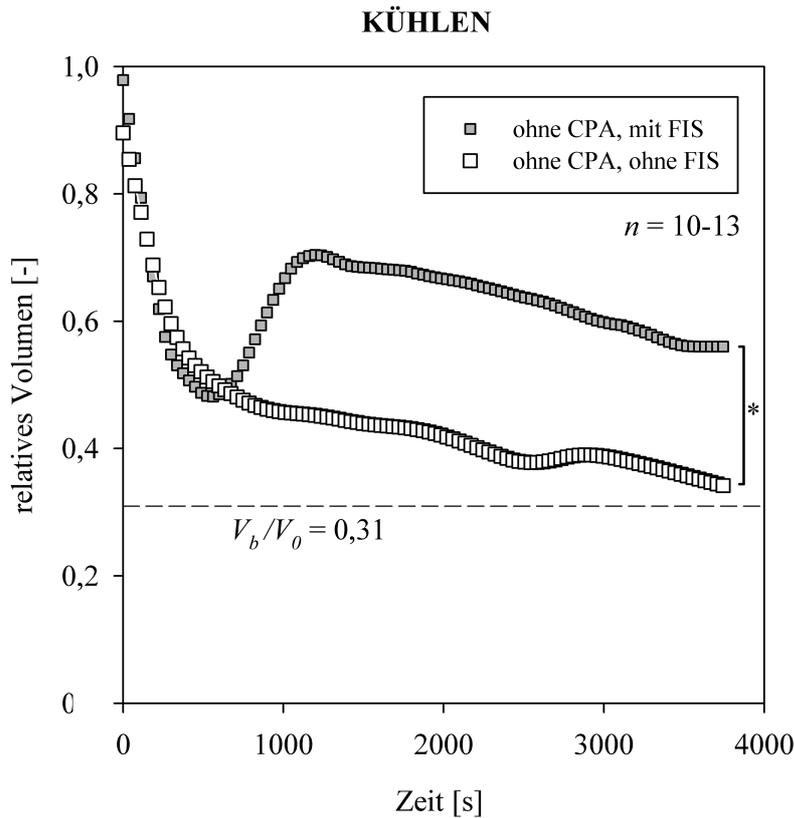
6.2 Effekte auf das Zell-Volumen

6.2.1 Freeze-Induced Swelling

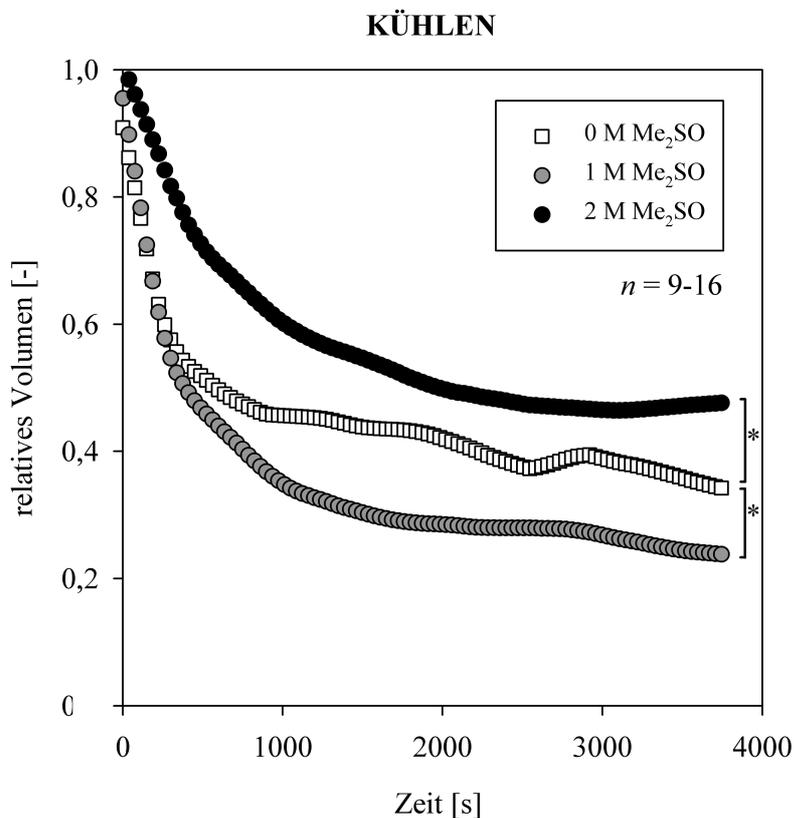
Humane Endothelzellen (HPMEC), die unter dem Kryomikroskop mit der Kühlrate von 1 K/min eingefroren wurden, konnten nach einem aktiven Nukleationsvorgang bei -8°C , anschließender Erwärmung knapp unterhalb der Schmelztemperatur und weiterer Kühlung bis -60°C , gut visualisiert und ihr Volumen automatisch vermessen werden. Es wurden besonders die Zellen ausgewertet, die im oder zwischen dem Eis, in den Bildaufnahmen kreisförmig erschienen. Es zeigte sich, dass das relative Zell-Volumen verschiedener Einzelzellen beim Einfrieren einer hohen Schwankung unterliegt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit alle zeitlichen Änderungen des relativen Zell-Volumens gemittelt ($n = 9-17$). Abb. 6.8 zeigt den zeitlichen Verlauf des relativen Zell-Volumens beim Kühlen in Anwesenheit von extrazellulärem Eis bis -60°C ohne Frierschutzmittel ($n = 10-13$). Ausgehend von dem isotonischen relativen Zell-Volumen $v_{rel} = 1$ schrumpfte die Mehrheit der Zellen (82,1%) bis zum osmotisch inaktiven Volumen $V_b = 0,31 \cdot V_0$, (weiße Quadrate). Einige individuelle Zellen (17,9%) schrumpften zunächst, schwellen an und schrumpften während des Einfrierens bis -60°C weiter (graue Quadrate). Das Anschwellen während des Einfrierens wurde hier als freeze-induced swelling (FIS) bezeichnet. Zellen mit FIS hatten bei -60°C im Vergleich zu Zellen ohne FIS ein signifikant geringeres Schrumpfen, $v_{rel} = 0,55$ (*, $p < 0,05$; t-Test).

6.2.2 Geringe Konzentrationen an Frierschutzmittel

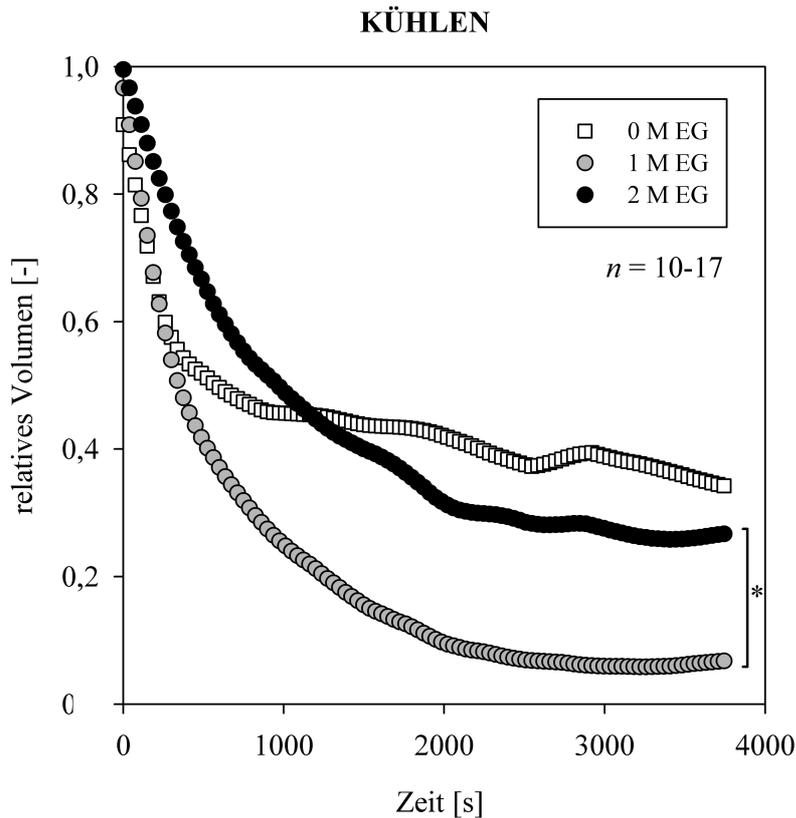
Unter dem Einsatz von Frierschutzmitteln wurden zu den in [Abb. 6.8](#) analoge kryomikroskopische Experimente durchgeführt. [Abb. 6.9](#) stellt zeitliche Verläufe des relativen Zell-Volumens von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dimethylsulfoxid (Me_2SO) dar, nämlich 0 M Me_2SO (weiße Quadrate), 1 M Me_2SO (graue Kreise) und 2 M Me_2SO (schwarze Kreise), $n = 9-16$. Beginnend bei dem relativen Volumen $v_{rel} = 1$ schrumpften die Zellen mit 0 M und 1 M Me_2SO bei hohen Temperaturen zunächst stärker als mit 2 M Me_2SO . Nach circa 300 s schrumpfte das relative Zell-Volumen mit 1 M Me_2SO stärker als das mit 0 M Me_2SO . Bei -60°C wurden die relativen Zell-Volumen von $v_{rel} = 0,23$ mit 1 M Me_2SO , von $v_{rel} = 0,34$ mit 0 M Me_2SO und von $v_{rel} = 0,50$ mit 2 M Me_2SO gemessen ($p < 0,05$; $n = 9-16$). Hieraus folgt, dass HPMEC-Zellen bei mittlerer Konzentration an Me_2SO am stärksten schrumpften. Vergleichbare kryomikroskopische Experimente wurden ebenfalls mit dem Frierschutzmittel Ethylenglycol (EG) durchgeführt. [Abb. 6.10](#) zeigt zeitliche Verläufe des relativen Zell-Volumens von HPMEC-Zellen mit variierenden Konzentrationen an EG, darunter 0 M EG (weiße Quadrate), 1 M EG (graue Kreise) und 2 M EG (schwarze Kreise), $n = 10-17$. Auch unter diesen Bedingungen schrumpften die Zellen mit 0 M und 1 M EG bei hohen Temperaturen zunächst stärker als mit 2 M EG. Nach circa 300 s schrumpfte das relative Zell-Volumen mit 1 M EG extrem bis -60°C auf $v_{rel} = 0,07$ ($p < 0,05$), verglichen mit dem Schrumpfen mit 0 M EG ($v_{rel} = 0,34$) und 2 M EG ($v_{rel} = 0,26$). Die kryomikroskopischen experimentellen Ergebnisse an HPMEC-Zellen mit Ethylenglycol zeigen, dass mittlere EG-Konzentrationen zu einem extremen Schrumpfen der Zellen führten. Ein direkter Vergleich von [Abb. 6.9](#) und [Abb. 6.10](#) verdeutlicht zusätzlich, dass das Zell-Schrumpfen mit 1 M EG stärker war als mit 1 M Me_2SO . Eine weitere Erkenntnis ist, dass das in Abschnitt 6.1.1 beschriebene FIS unter dem Einsatz von den Frierschutzmitteln EG und Me_2SO nicht auftrat.

**Abb. 6.8:**

Relatives Volumen von HPMEC-Zellen beim Einfrieren mit 1 K/min bis -60°C ohne Frierschutzmittel in Anwesenheit von extrazellulärem Eis. Die Mehrzahl der Zellen schrumpfte vom isotonischen Volumen nahe zum osmotisch inaktiven Volumen V_b (weiße Quadrate). Einige wenige Zellen (17,9%) schwollen jedoch nach circa 500 s bis 1200 s an (graue Quadrate), hier FIS (engl.: freeze-induced swelling) benannt. Das nach ~ 3700 s bei -60°C erreichte Zell-Volumen der beiden Kurvenverläufe unterschied sich signifikant (*, $p < 0,05$; t-Test; $n = 10-13$).

**Abb. 6.9:**

Relatives Zell-Volumen beim Kühlen mit 1 K/min bis -60°C mit 0 M, 1 M und 2 M Me_2SO in Anwesenheit von extrazellulärem Eis; Mittelwertbildung aus $n = 9-16$. Das Zell-Schrumpfen war mit 1 M Me_2SO stärker (graue Kreise) und mit 2 M Me_2SO geringer (schwarze Kreise), im Vergleich zur Kontrolle mit 0 M Me_2SO (weiße Quadrate) (*, $p < 0,05$; t-Test), vgl. [186].

**Abb. 6.10:**

Relatives Zell-Volumen beim Kühlen mit 1 K/min bis -60°C mit 0 M, 1 M und 2 M EG in Anwesenheit von extrazellulärem Eis; Mittelwertbildung aus $n = 10-17$. Extremes Zell-Schrumpfen fand mit 1 M EG statt (graue Kreise), im Vergleich mit 2 M EG (schwarze Kreise) und der Kontrolle mit 0 M EG (weiße Quadrate) (*, $p < 0,05$; t-Test), vgl. [186].

Experimente zur Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens von HPMEC-Zellen wurden am Coulter Counter durchgeführt, um den Einfluss der Frierschutzmittelkonzentration bei Raumtemperatur zu bestimmen. [Abb. 6.11](#) zeigt die Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens von HPMEC-Zellen im Kulturmedium unter isotonen Bedingungen in Abwesenheit von Frierschutzmitteln in einer einfach logarithmischen Darstellung. Eine Gaußsche Regression der gemittelten Zell-Volumen-Messwerte ($n = 3$) ergab einen Bestimmtheitsgrad von $R^2 = 0,90$. Die meisten Zellen besaßen ein Volumen von $2109 \mu\text{m}^3$. Nach Gleichung 5.1 ergibt sich unter der Annahme einer sphärischen Zell-Geometrie ebenfalls eine gaußförmige Häufigkeitsverteilung der aktiven Zelloberfläche A . Mit anderen Worten bedeutet dies, dass der in Gleichung 3.26 bis Gleichung 3.28 genutzte konstante Wert für die Zelloberfläche A nicht für alle Zellen einer Zellpopulation gilt. Die Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens nach der Kryokonservierung ist in [Abb. 6.12](#) unter Nutzung von 0 M, 1 M und 2 M Me_2SO dargestellt ($n = 3$). Daraus ist ersichtlich, dass die Mittelwerte des Zell-Volumens nach dem Kryokonservierungsvorgang im Vergleich zu den Mittelwerten des Zell-Volumens vor dem Kryokonservierungsvorgang (vgl. [Abb. 6.11](#)) verringert wurden. Da zur Erstellung von [Abb. 6.12](#) bei jeder Messung eine konstante Zellzahl von 20.000 Partikeln untersucht wurde, ist von einem konstanten Integralwert jeder Kurve auszugehen. Die Kurve ohne Frierschutzmittel (weiße Quadrate, 0 M Me_2SO , kryo) zeigt, dass einige Zellfragmente entstanden sind, was durch eine Erhöhung der Zell-Volumen-Häufigkeitsverteilung im

Bereich von ~ 200 bis $\sim 1000 \mu\text{m}^3$ zu erkennen ist. Während mit 2 M Me_2SO nur eine geringe Anzahl an Zellfragmenten bei $\sim 600 \mu\text{m}^3$ entstanden ist (schwarze Kreise), ist bei 1 M Me_2SO die Anzahl der Zell-Fragmente am geringsten (graue Kreise).

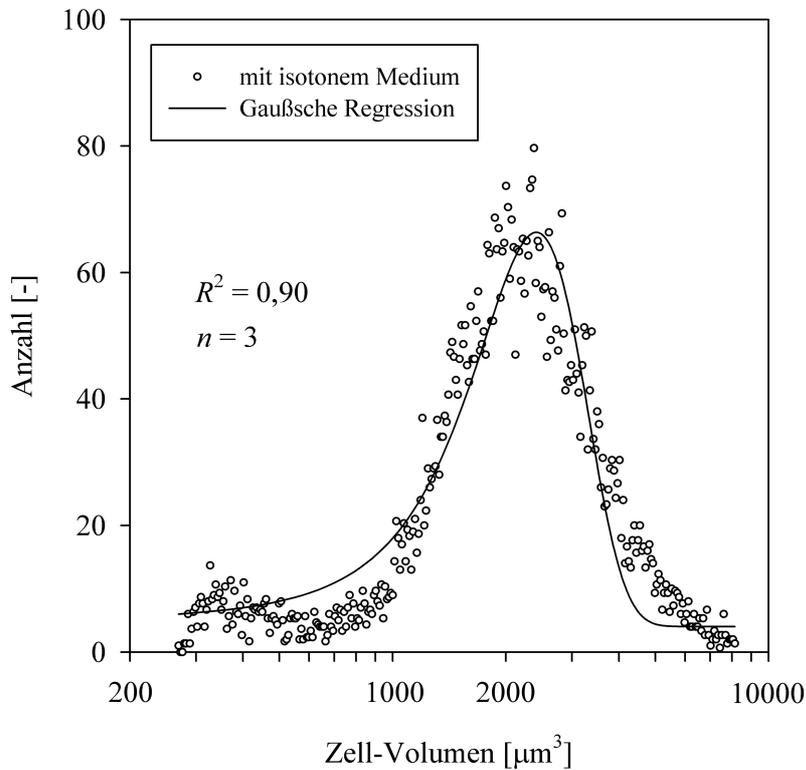


Abb. 6.11:

Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens von HPMEC-Zellen ohne Frierschutzmittel in isotonem Kulturmedium bestimmt mittels Coulter Counter. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messungen. Eine Gaußsche Regression ergibt den Bestimmtheitsgrad von $R^2 = 0,90$. Das Zell-Volumen weist einen Mittelwert bei $2321 \mu\text{m}^3$ auf.

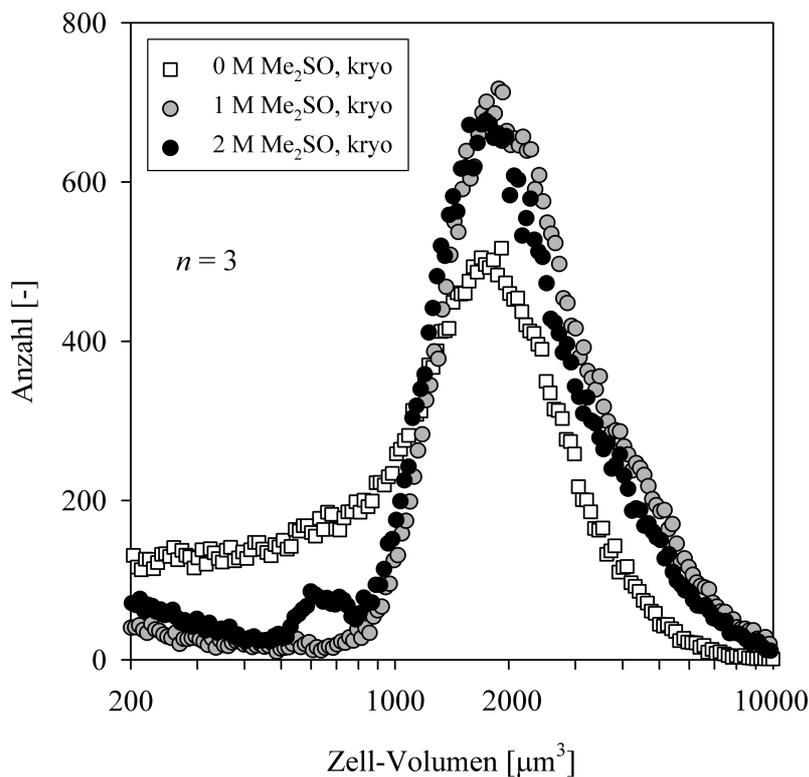


Abb. 6.12:

Häufigkeitsverteilung des Zell-Volumens von kryokonservierten HPMEC-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Frierschutzmittel (0 M, 1 M, 2 M Me_2SO) bestimmt mittels Coulter Counter ($n = 3$). Das Zell-Volumen besitzt Mittelwerte von $1741 \mu\text{m}^3$ mit 0 M Me_2SO , $1868 \mu\text{m}^3$ mit 1 M Me_2SO und $1695 \mu\text{m}^3$ mit 2 M Me_2SO .

6.2.3 Totzeit und Post-Thaw Swelling

Nach dem Kühlen bis -60°C erfolgte das Erwärmen der HPMEC-Zellen unter dem Kryomikroskop mit einer Haltezeit von 10 Minuten bei 4°C . Das relative Volumen der nach [Abb. 6.8](#) ohne Frierschutzmittel eingefrorenen Zellen ist in [Abb. 6.13](#) während des Erwärmens dargestellt; Mittelwerte aus $n = 10-13$. Zu Beginn des Erwärmens von -60°C schollen die Zellen zunächst leicht an. Nach circa 40 s schmolz schließlich vorhandenes intrazelluläres Eis, gefolgt vom Schmelzen des extrazellulären Eises. Während einer bestimmten Zeitdauer befand sich das relative Volumen der Zellen unter diesen Bedingungen auf einem vorläufigen Sättigungswert ($v_{rel} = 0,34$), die hier als Totzeit t_{tot} definiert wurde. Das bedeutet, dass während dieser Totzeit kein nachweisliches Schrumpfen oder Schwellen des relativen Zell-Volumens stattfand. Nach der Totzeit schollen die Zellen auf circa das Doppelte ihres isotonischen Wertes an. [Abb. 6.14](#) zeigt das relative Volumen von HPMEC-Zellen mit den Frierschutzmitteln 1 M Me_2SO (hellgraue Kreise) und 1 M EG (dunkelgraue Kreise) und die Kontrolle ohne CPA, ohne FIS (weiße Quadrate); Mittelwerte aus $n = 10-17$. Im Vergleich zur Kontrolle schollen die Zellen mit Frierschutzmitteln langsamer und blieben mit 1 M EG unterhalb ihres isotonischen Volumens bei $v_{rel} = 1$ oder erreichten dieses mit 1 M Me_2SO (*, $p < 0,05$; t-Test).

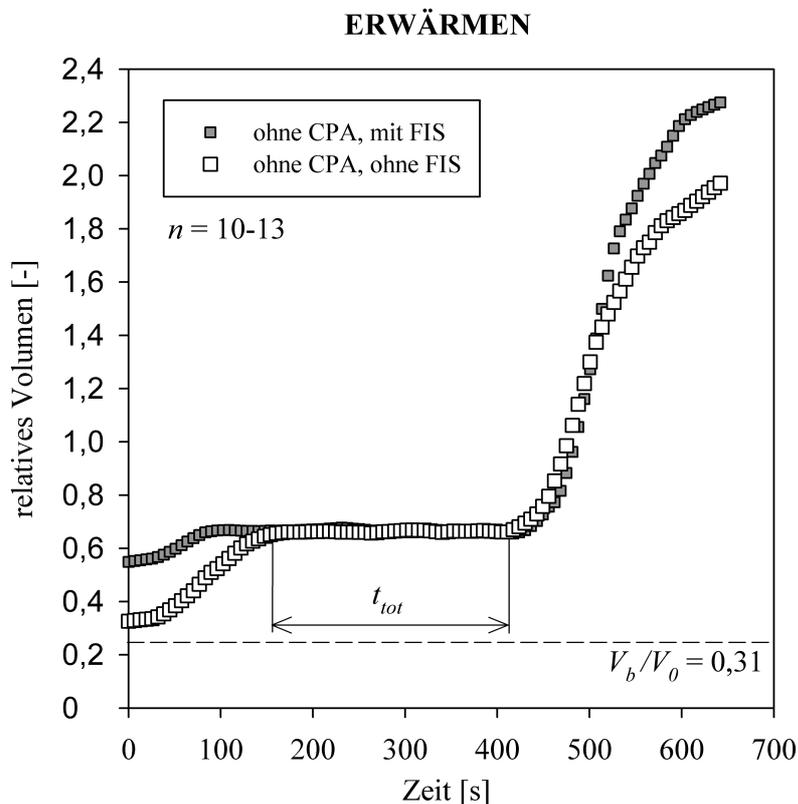
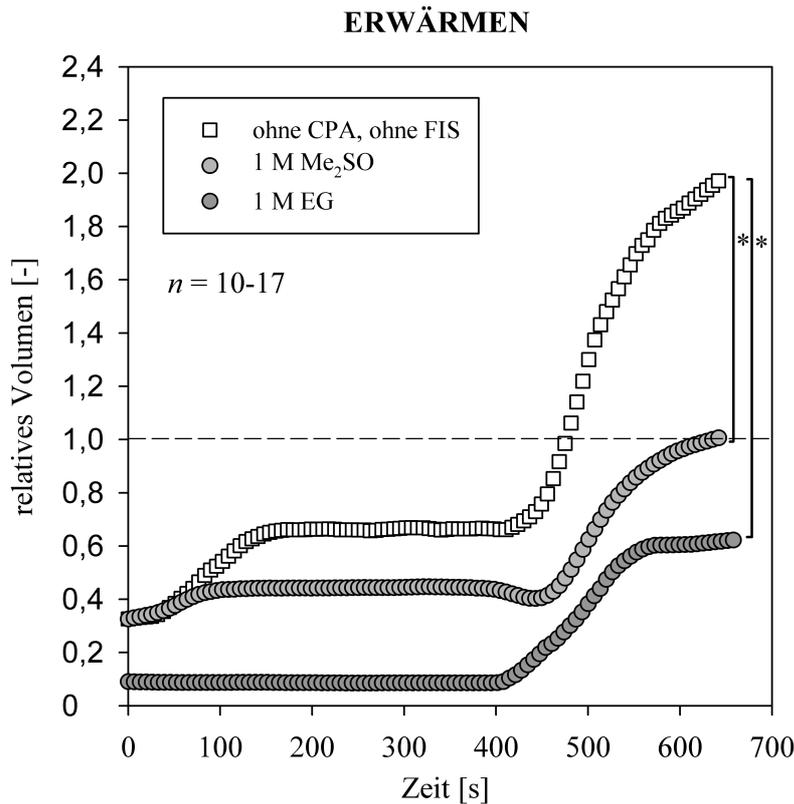


Abb. 6.13:

Relatives Volumen von HPMEC-Zellen beim Erwärmen mit 100 K/min bis 4°C und einer Haltezeit von 10 Minuten in Abwesenheit von Frierschutzmitteln; Mittelwertbildung aus $n = 10-13$. Während einer Totzeit t_{tot} bei 4°C erfolgte keine Änderung des relativen Volumens. Die Totzeit variierte bei den unterschiedlichen Bedingungen und ist hier für den Fall ohne CPA, ohne FIS eingezeichnet mit $t_{tot} = 255$ s. Ein graduelles Zell-Schwellen folgte auf den circa doppelten Wert des isotonisch relativen Volumens.

**Abb. 6.14:**

Relatives Volumen von HPMEC-Zellen beim Erwärmen mit 100 K/min bis 4°C und einer Haltezeit von 10 Minuten, in Anwesenheit von Frierschutzmitteln und der Kontrolle (ohne CPA, ohne FIS); Mittelwertbildung aus $n = 10-17$. Während einer Totzeit t_{tot} bei 4°C erfolgte keine Änderung des relativen Volumens. Mit den untersuchten Konzentrationen an permeierenden Frierschutzmitteln wurde das isotonische Zell-Volumen nicht überschritten (*, $p < 0,05$; t-Test), vgl. [186].

6.3 Effekte auf Proteine und Membranen

6.3.1 Denaturierungstemperatur von Proteinen

Fourier-Transform Infrarotspektroskopie-Messungen von HPMEC-Zell-Pellets mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me₂SO zeigten eine konzentrationsabhängige Änderung im Amid-I-Band bei hohen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 90°C. [Abb. 6.15](#) stellt die Ableitung der Fläche des Amid-I-Bandes in Abhängigkeit der Temperatur dar. Mit Zellen ohne Frierschutzmittel ist der Kurvenverlauf im Bereich von circa 40°C bis 80°C positiv (weißes Quadrate). Mit 15% Me₂SO oder 2,1 M Me₂SO verschiebt sich der Kurvenverlauf zu tieferen Temperaturen in den positiven Bereich zwischen circa 30°C bis 70°C (schwarze Sterne). Es existiert eine von Me₂SO konzentrationsabhängige Verschiebung der Kurve zu tieferen Temperaturen. Diese Änderung im Amid-I-Band wurde auf einen Anstieg einer Wärme-induzierten Denaturierung von zellulären Proteinen von der α -Helix zum β -Faltblatt

zurückgeführt [28], [183]. Daraus folgt, dass Me_2SO die Denaturierungstemperatur konzentrationsabhängig verringerte.

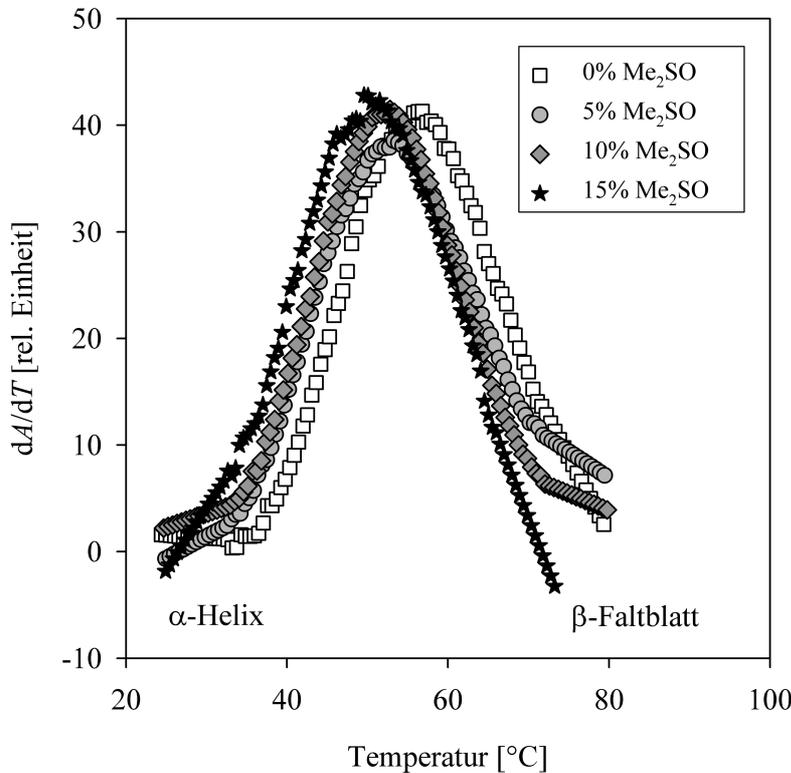


Abb. 6.15:

Änderung der Denaturierung von zellulären Proteinen in Abhängigkeit von der Temperatur. Mit steigender Me_2SO -Konzentration (0% Me_2SO , weiße Quadrate bis 15% Me_2SO , schwarze Sterne) sinkt die Denaturierungstemperatur, bei der eine Protein-Konformationsänderung von der α -Helix zum β -Faltblatt stattfindet, vgl. [183].

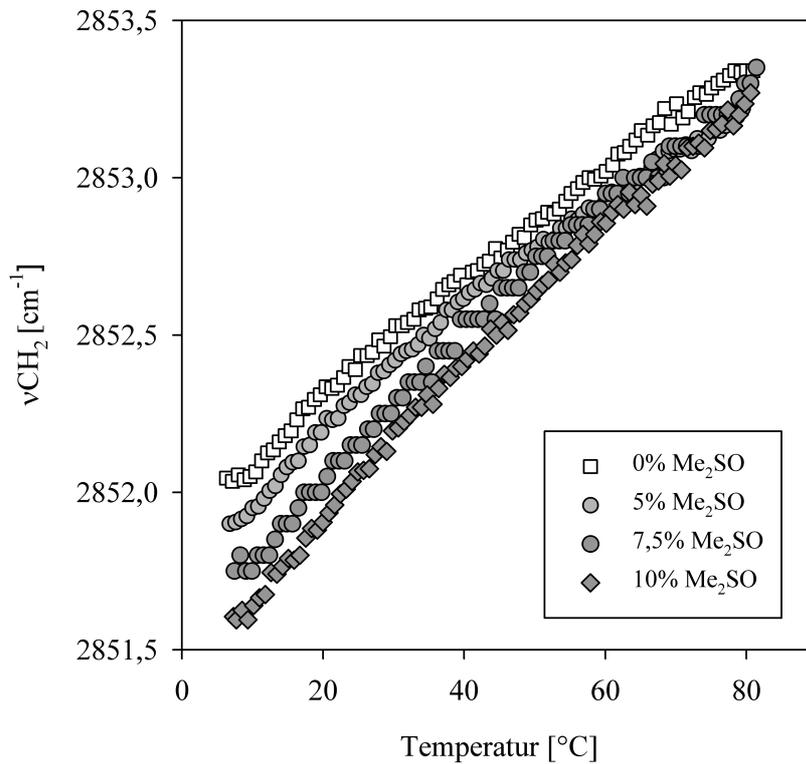
6.3.2 Zellmembranen bei Temperaturen von 10°C bis 90°C

Die Analyse des Infrarotspektrums im Lipid-Band bei Wellenzahlen von $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ zeigte eine Abhängigkeit der νCH_2 -Position von der Temperatur und Frierschutzmittelkonzentration. Aufgrund einer thermotropen Änderung der Membranen sank die Wellenzahl im Lipid-Band bei einer gegebenen Frierschutzmittelkonzentration bei tieferen Temperaturen. Abb. 6.16 zeigt, dass die Wellenzahl im Lipid-Band unter Nutzung von Me_2SO -Konzentrationen zwischen 0% und 10% mit steigender Konzentration sank. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 6.17, dass bei einer höheren Konzentration von 15% die Wellenzahl im Lipid-Band mit steigender Konzentration anstieg. Hier wird deshalb eine limitierende Frierschutzmittelkonzentration C_{limit} definiert, bei der die Wellenzahl im Lipid-Band bei gegebener Temperatur nicht weiter sinkt und unter diesen Bedingungen den Wert $C_{\text{limit}} = 10 \text{ Vol.-%}$ ($C_{\text{limit}} = 1,4 \text{ M}$) annimmt. Während bei 80°C gleiche Wellenzahlen erreicht wurden, wurde bei 10°C eine

maximale Wellenzahl-Differenz von $0,44 \text{ cm}^{-1}$ zwischen 0% und 10% Me_2SO erreicht (Abb. 6.16, Abb. 6.17).

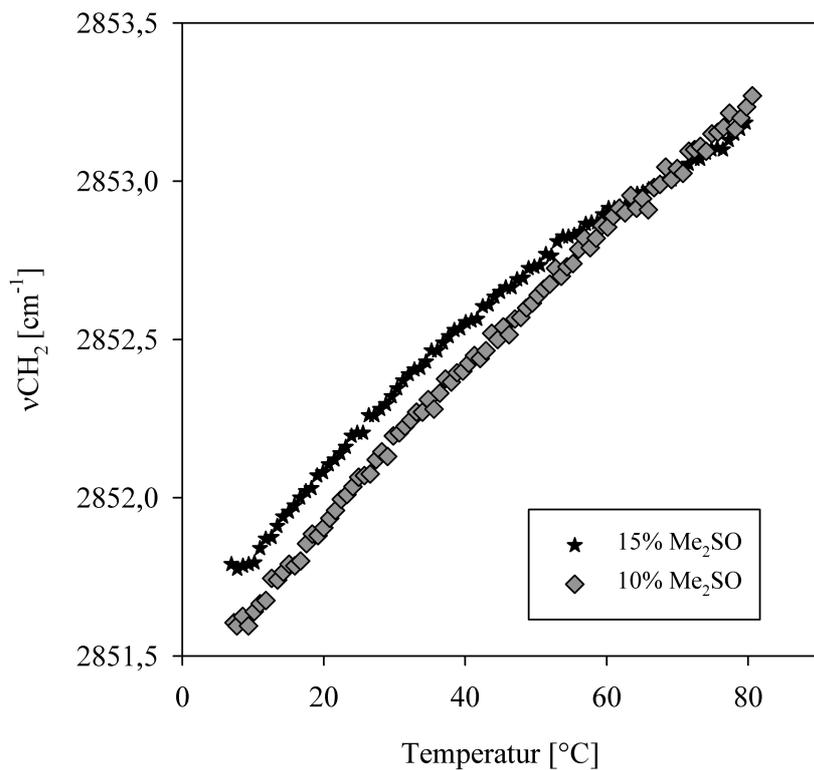
6.3.3 Zellmembranen bei Temperaturen von 10°C bis -45°C

Bei tieferen Temperaturen, unterhalb der jeweiligen Temperaturen des Gleichgewichtsfrierpunkts der Proben, setzten sich die thermotrophen Änderungen der Membranen ohne Nukleation auch im unterkühlten Zustand fort. Durch eine Nukleation konnte zusätzlich eine lyotrophe Änderung der Membranen, insbesondere bei hohen Nukleationstemperaturen, erfolgen. Während der Temperaturniedrigung der Proben erfolgte bei der Nukleation in Anwesenheit von Frierschutzmitteln (Me_2SO oder EG) aufgrund einer lyotropen Membranänderung eine zusätzliche Verschiebung der νCH_2 -Position zu niedrigeren Werten. In Abwesenheit von Frierschutzmitteln hatte die spontane Nukleation keinen zusätzlichen Einfluss auf die νCH_2 -Position. Abb. 6.18 zeigt, dass die Wellenzahl im Lipid-Band unter Nutzung von Me_2SO -Konzentrationen zwischen 0% und 5% mit steigender Konzentration sank. Man beachte, dass durch eine Mittelung der Messkurven eine Nukleation nicht mehr ersichtlich ist. Aus diesem Grund sind in den Abb. 6.18, Abb. 6.20, Abb. 6.21 und Abb. 6.22 repräsentative Einzelmessungen dargestellt. In Abb. 6.19 wird eine Mittelwertbildung der Kurven ($n = 5-7$) gezeigt, um den signifikanten Unterschied der Kurven zu verdeutlichen. Im Gegensatz dazu ist in Abb. 6.20 dargestellt, dass bei einer höheren Konzentration von 10% bis 15% die Wellenzahlen im Lipid-Band mit steigender Konzentration wieder ansteigen. Beim Kühlen von HPMEC-Zellen mit Me_2SO von 10°C bis -45°C war die limitierende Frierschutzmittelkonzentration $C_{\text{limit}} = 5 \text{ Vol.-%}$ ($C_{\text{limit}} = 0,7 \text{ M}$). Es wurde eine maximale Wellenzahl-Differenz von $1,01 \text{ cm}^{-1}$ zwischen 0% und 5% Me_2SO erreicht (Abb. 6.18, Abb. 6.19). Zu den Diagrammen in Abb. 6.18 und Abb. 6.20 mit Me_2SO wurden

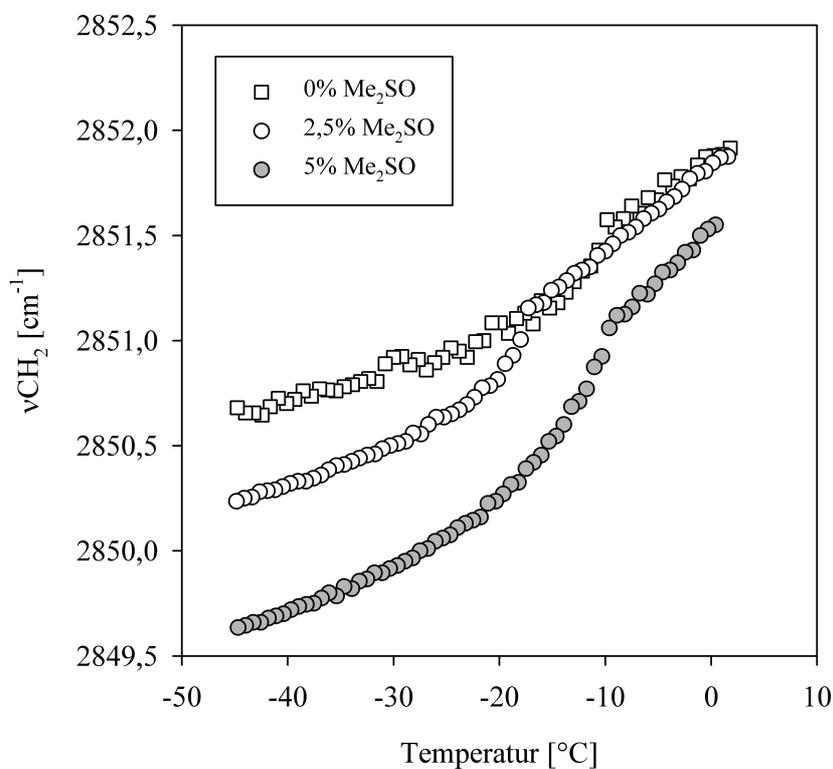
**Abb. 6.16:**

Abhängigkeit der ν_{CH_2} -Position von der Temperatur von 10°C bis 90°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me_2SO mit 0% (weiße Quadrate), 5% (hellgraue Kreise), 7,5% (dunkelgraue Kreise) und 10% (dunkelgraue Rauten).

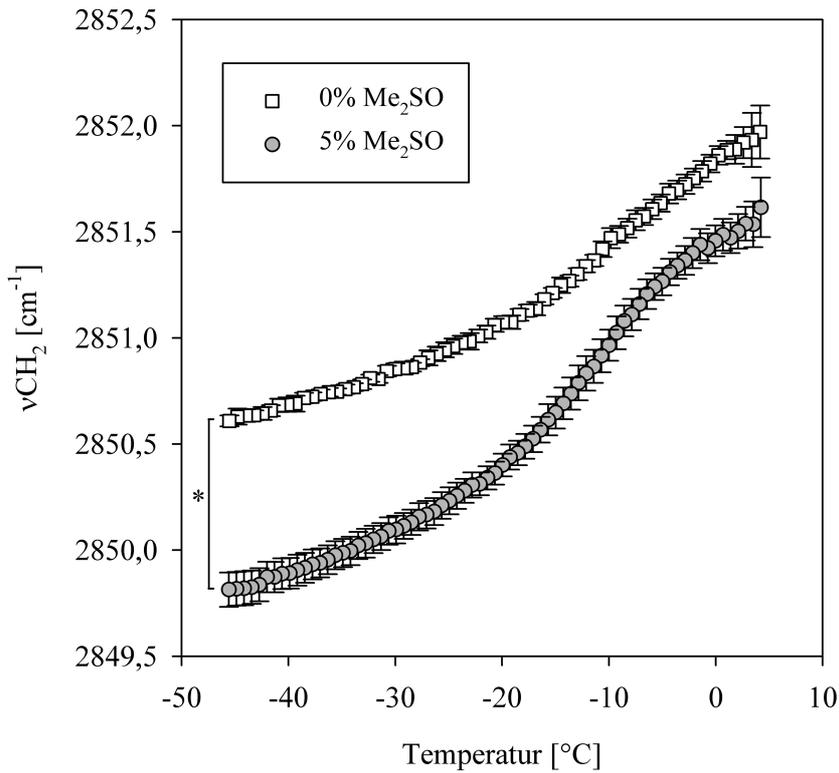
vergleichbare FTIR-Ergebnisse mit EG bei Temperaturen von 10°C bis -45°C erstellt. Abb. 6.21 zeigt, dass die Wellenzahl im Lipid-Band unter Nutzung von EG-Konzentrationen zwischen 0 M und 1 M mit steigender Konzentration sank. Bei höheren EG-Konzentrationen von 1,5 M und 2 M EG hingegen stieg die Wellenzahl im Lipid-Band wieder (Abb. 6.22). Die limitierende Frierschutzmittelkonzentration betrug damit $C_{\text{limit}} = 1 \text{ M}$. Beim Gefrieren von HPMEC-Zellen mit EG bei Temperaturen von 10°C bis -45°C wurde eine maximale Wellenzahl-Differenz von $1,33 \text{ cm}^{-1}$ zwischen 0 M und 1 M EG erreicht (Abb. 6.21, Abb. 6.22).

**Abb. 6.17:**

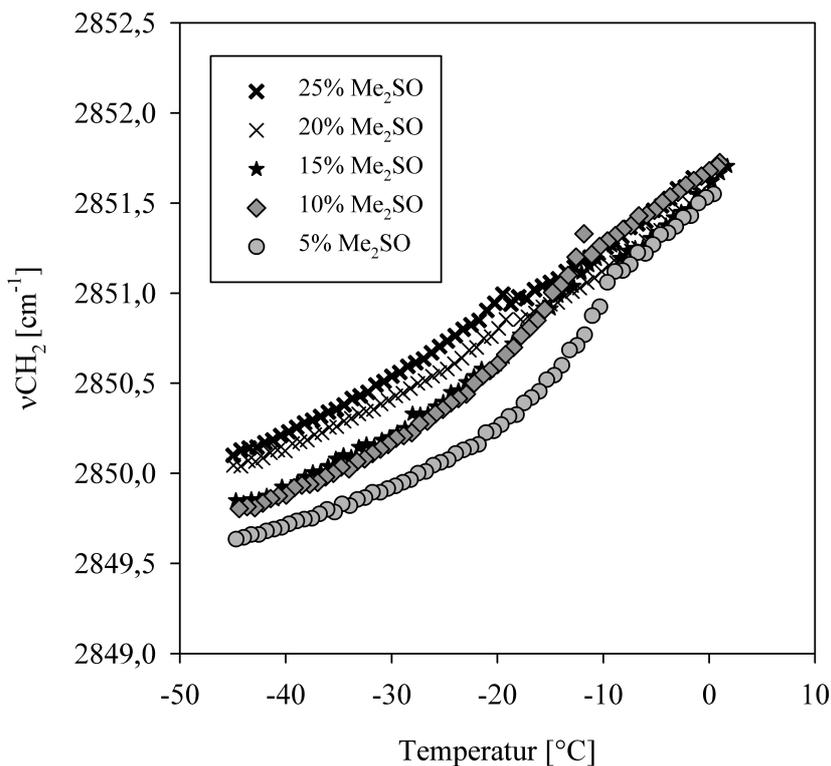
Abhängigkeit der νCH_2 -Position von der Temperatur von 10°C bis 90°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me $_2$ SO mit 10% (dunkelgraue Rauten) und 15% (schwarze Sterne).

**Abb. 6.18:**

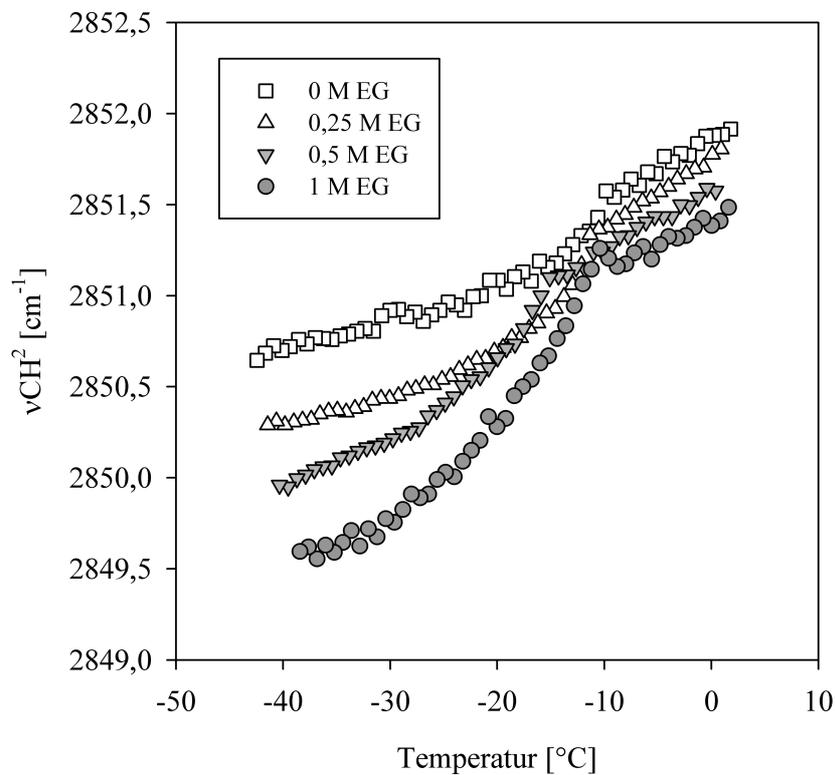
Abhängigkeit der νCH_2 -Position von der Temperatur von 10°C bis -45°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me $_2$ SO mit 0% (weiße Quadrate), 2,5% (weiße Kreise) und 5% (hellgraue Kreise).

**Abb. 6.19:**

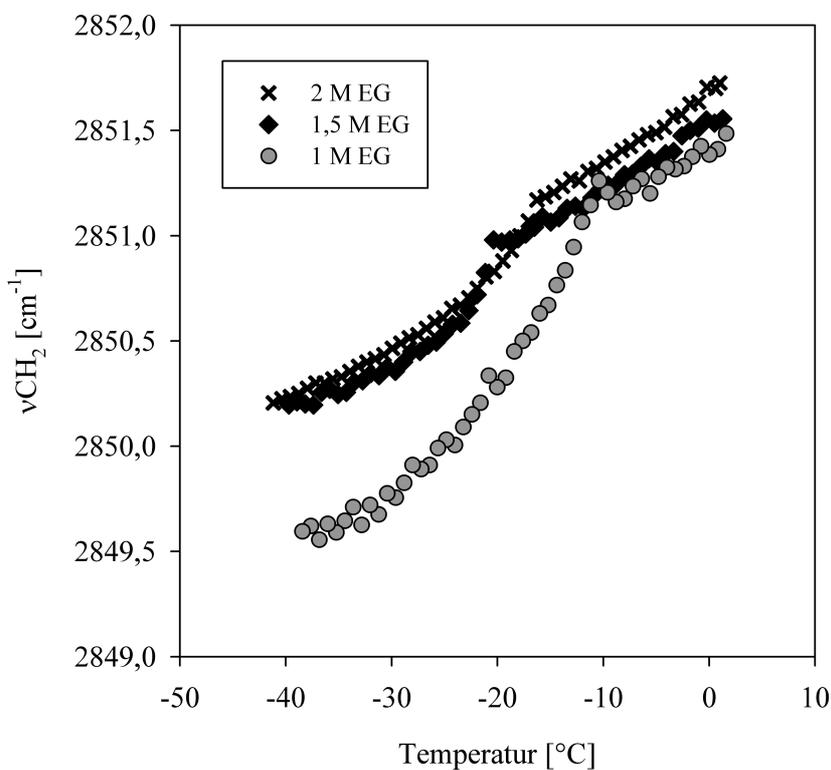
Abhängigkeit der νCH_2 -Position von der Temperatur von $\sim 10^\circ\text{C}$ bis -45°C von HPMEC-Zellen mit 0% (weiße Quadrate) und 5% (hellgraue Kreise). Durch die Mittelwertbildung von $n = 5-7$ ist ein Knick in den Kurvenverläufen bei der Nukleationstemperatur nicht mehr erkennbar (*, $p < 0,0001$; t-Test).

**Abb. 6.20:**

Abhängigkeit der νCH_2 -Position von der Temperatur von 10°C bis -45°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Me_2SO mit 5% (hellgraue Kreise), 10% (dunkelgraue Rauten), 15% (schwarze Sterne), 20% (dünne Kreuze) und 25% (dicke Kreuze).

**Abb. 6.21:**

Abhängigkeit der ν_{CH_2} -Position von der Temperatur von 10°C bis -45°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EG mit 0 M (weiße Quadrate), 0,25 M (weiße Dreiecke), 0,5 M (dunkelgraue Dreiecke), und 1 M (dunkelgraue Kreise).

**Abb. 6.22:**

Abhängigkeit der ν_{CH_2} Position von der Temperatur von 10°C bis -45°C von HPMEC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EG mit 1 M (dunkelgraue Kreise), 1,5 M (schwarze Rauten) und 2 M (dicke Kreuze).

6.4 Effekte auf die Überlebensrate

HPMEC-Zellen, die unter dem Kryomikroskop mit 5% Me₂SO kontrolliert im Temperaturbereich von -12°C bis -2°C nukleiert und mit einer Kühlrate von 5 K/min eingefroren wurden, zeigten nach dem Auftauen eine Abhängigkeit ihrer Überlebensrate von der Nukleationstemperatur. Die Überlebensrate wurde dabei mit einer Fluoreszenzfärbung bestimmt (vgl. Anhang, Abschnitt 10.4). Abb. 6.23 zeigt, dass kryokonservierte HPMEC-Zellen mit hohen Nukleationstemperaturen von -2°C bis -4°C hohe relative Überlebensraten von 90% erreichten ($n = 4-7$).

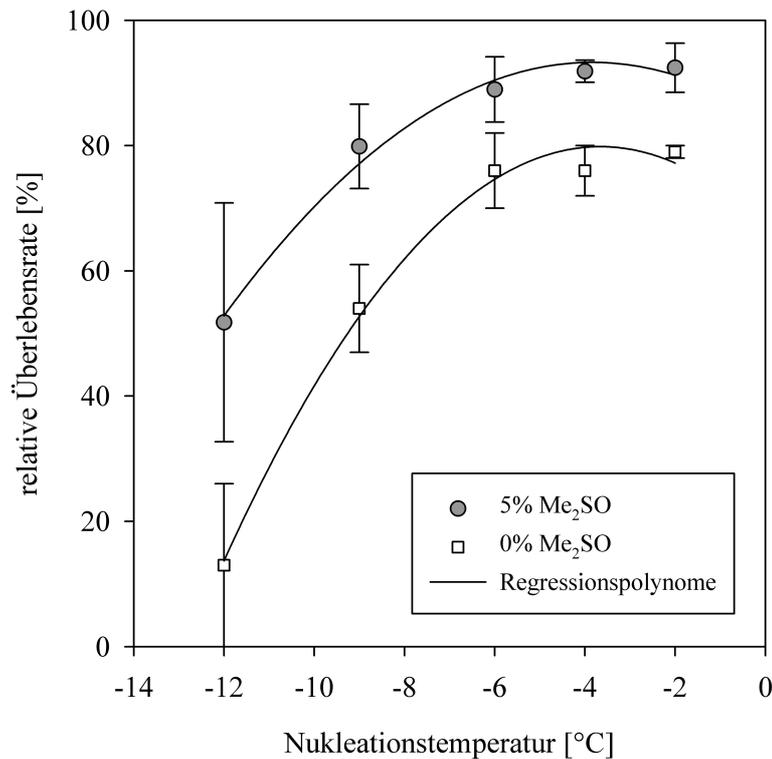


Abb. 6.23: Die Abhängigkeit der relativen Überlebensrate von humanen Endothelzellen (HPMEC) von der Nukleationstemperatur mit 0% und 5% Me₂SO. Die Proben wurden unter dem Kryomikroskop kryokonserviert und anschließend mittels Fluoreszenzfärbung auf relative Überlebensrate getestet. Ein Maximum der relativen Überlebensrate wurde bei hohen Nukleationstemperaturen von -2° bis -4°C erreicht, ($n = 4-7$).

Bei tieferen Nukleationstemperaturen von -12°C wurden dagegen nur relative Überlebensraten von 74% bestimmt.

Die im automatischen Einfriergerät CM2000 gekühlten und mittels des Frierblocks nukleierten HPMEC-Zellsuspensionen wurden nach dem Auftauen auf die Integrität ihrer Membran getestet (vgl. Anhang, Abschnitt 10.4). Aus Abb. 6.24 ist ersichtlich, dass die Kontrolle mit 0% Me₂SO nur geringe Membran-Integritäten von ~55% bei $T_n = -6^\circ\text{C}$ lieferte. Mit 2,5% Me₂SO wurde ein Maximum der Membran-Integrität von ~90% bei $T_n = -6^\circ\text{C}$ erzielt und mit 5% Me₂SO wurde ein Membran-Integritäts-Maximum von ~90% bei $T_n = -12^\circ\text{C}$ erreicht ($n = 24$). Bei niedrigen Nukleationstemperaturen wurden die gemessenen Membran-Integritäten bei den untersuchten Frierschutzmittelkonzentrationen geringer. Außerdem sind die Fehlerbalken der Ordinate aufgrund einer spontanen Nukleationstemperatur vergrößert (Abb. 6.24). Daraus folgt, dass ähnlich hohe Membran-Integritäten von ~90% bei hohen Nukleationstemperaturen unter Verringerung der Frierschutzmittelkonzentration an Me₂SO erzielt wurden.

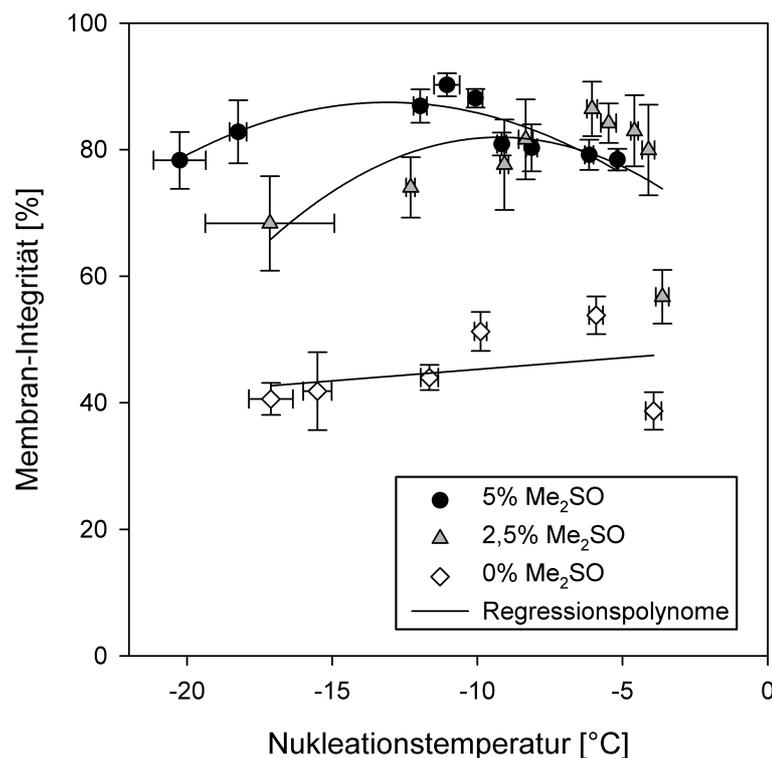


Abb. 6.24: Die Abhängigkeit der Membran-Integrität von humanen Endothelzellen (HPMEC) von der Nukleationstemperatur, $n = 24$: Variiert wurde die Konzentration an Me₂SO (0%, 2,5%, 5%) bei programmierter Kühlrate des Einfriergerätes CM2000 von 5 K/min und dem Probenvolumen von 1 mL Zellsuspension pro Kryoröhrchen. Das Diagramm zeigt, dass mit 5% Me₂SO eine hohe Membran-Integrität von ~90% bei mittleren Nukleationstemperaturen von -12°C erreicht wurde. Außerdem wurde eine ähnlich hohe Membran-Integrität bei höheren Nukleationstemperaturen unter Verringerung der Frierschutzmittelkonzentration von 2,5% erzielt (Prozentangaben in Vol.-%).

7 VERLEICH ZWISCHEN THEORIE UND PRAXIS

Wärmetransport:

Basierend auf den FEM-Simulationen der erstellten SolidWorks®-Modelle (Abschnitt 4.1) konnte gezeigt werden, dass beim Kühlen der Proben in der FTIR, dem Kryomikroskop sowie in dem automatischen Einfriergerät CM2000 die Wärme homogen abgeführt werden konnte. Die Voraussetzung war hierbei das Kühlen mit niedrigen Kühlraten, die bei den gewählten Simulationsbedingungen von 1 bis 5 K/min gegeben waren. Experimentelle Messungen der Temperaturverteilung wurden mit einem digitalen Thermometer (Fluke 53 II, T-Typ) an der FTIR, am Kryomikroskop und am automatischen Einfriergerät durchgeführt, die die Simulationen hinsichtlich der homogenen Wärmeabfuhr von den Proben bestätigten.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Wärmeabfuhr spielte hierbei die Probengeometrie, die Probengröße und die effektive Wärmeleitfähigkeit der Proben. In Anbetracht einer homogenen Wärmeabfuhr wurde im Fall der Kryomikroskopie das Probenvolumen mit 5 μL dünnsschichtig in den Probenhalter (Quarztiegel) aufgetragen. Größere Probenvolumina, wie in der FTIR (15 μL) und in dem automatischen Einfriergerät (1 mL pro Kryoröhrchen), besitzen nach Heschel [77] innerhalb der Probe inhomogene Temperaturverläufe. In den FEM-Simulationen wurde Wasser als Probenmaterial mit der Nukleationstemperatur bei -5°C definiert. Diese Definition stellte eine Näherung der realen Verhältnisse dar, da Zellen bis zu 85% anteilig aus Wasser bestehen [66]. In den hier durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurden üblicherweise HPMEC-Zellsuspensionen und Zellpellets untersucht. Zu Fehlerabschätzung der Näherung der Simulationen wurden vergleichende FTIR-Experimente an CPA-Lösungen mit und ohne Zellen durchgeführt (Anhang, Abb. 10.1). Diese zeigten eine verringerte Kristallisationskinetik bei niedrigeren Zelldichten und höheren CPA-Konzentrationen (vgl. Abschnitt 6.1.1).

Stofftransport:

Das osmotische Dehydrierungs-Verhalten des HPMEC-Zellmodells wurde in dieser Arbeit sowohl durch Matlab®-Simulationen des Wassertransportmodells als auch mittels verschiedenen experimentellen Methoden untersucht. In den Simulationen wurde vom osmotischen

Verhalten einer repräsentativen Zelle ausgegangen und folgt damit einer gängigen Herangehensweise [43], [75], [216]. Die experimentellen Ergebnisse des Zell-Volumens zeigen jedoch starke Variationen im Zell-Volumen während einer Coulter Counter-Messung (vgl. Abschnitt 6.2.2) bei Raumtemperatur und bei den kryomikroskopischen Untersuchungen bei tieferen Temperaturen. Zusätzlich ist nach Porsche et al. bekannt, dass auch Variationen der hydraulischen Konduktivität von Zellen innerhalb einer Charge bestehen [161].

Tab. 7.1. stellt simulierte und experimentell ermittelte Ergebnisse der Volumina von HPMEC-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen (0 M, 1 M und 2 M) an Dimethylsulfoxid und Ethylenglycol zusammen. Danach liegt das experimentell ermittelte, osmotisch inaktive Zell-Volumen V_b/V_0 immer unterhalb der simulierten Zell-Volumen V/V_0 bei -60°C . Die kryomikroskopischen Ergebnisse der Zellvolumina weisen bei mittleren Konzentrationen eine starke Abweichung gegenüber den simulierten Zellvolumina auf, bei 1 M Me_2SO 23,7% anstatt 40,2% und bei 1 M EG 6,6% anstatt 42,5%.

Tab. 7.1: Vergleich der HPMEC-Zellvolumina bei unterschiedlichen Konzentrationen an Dimethylsulfoxid (Me_2SO) und Ethylenglycol (EG): Die Coulter Counter-Messungen lieferten das osmotisch inaktive Zell-Volumen V_b/V_0 bei RT (Anhang 10.3.1). Ebenfalls aufgelistet sind die Ergebnisse der Matlab[®]-Simulationen (Abschnitt 4.2.3) und der kryomikroskopischen Untersuchungen (Abschnitt 6.2.2) mit dem relativen Zell-Volumen V/V_0 bei -60°C ($n = 4-6$).

| Frierschutzmittel (CPA) | Coulter Counter V_b/V_0 bei RT [%] | Simulation V/V_0 bei -60°C [%] | Kryomikroskopie V/V_0 bei -60°C [%] |
|----------------------------|--|--|---|
| ohne CPA (Kontrolle) | 33,9 (31,0) ⁵ | 35,6 | 34,1 |
| 1 M Me_2SO | 38,5 | 40,2 | 23,7 |
| 2 M Me_2SO | 41,1 | 42,8 | 47,9 |
| 1 M EG | 40,8 | 42,5 | 6,6 |
| 2 M EG | 46,0 | 47,7 | 27,1 |

Ohne Frierschutzmittel besaßen die simulierten $V(t)$ -Kurvenverläufe (Abb. 4.7) eine anfängliche Steigung von $0,002 \text{ s}^{-1}$ und hatten die gleiche Größenordnung wie die anfängliche Steigung der experimentellen $V(t)$ -Kurven von $0,009 \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 6.8).

⁵ Im Vergleich zu den Ergebnissen mit Kulturmedium wurde unter Verwendung von PBS niedrigere Werte für das osmotisch inaktive Zell-Volumen ($V_b/V_0 = 31,0\%$) mittels der Coulter Counter-Technik ermittelt (vgl. Anhang, Abb. 10.4).

Bei den experimentellen Untersuchungen mit Frierschutzmitteln hing der Verlauf der Zellschrumpfung nach der Nukleation entscheidend von der Konzentration an Membranpermeierenden Frierschutzmitteln wie Dimethylsulfoxid und Ethylenglycol ab. Die experimentell gefundenen Effekte dieser Frierschutzmittel auf das Zellschrumpfen können wie folgt erklärt werden (vgl. [Abb. 6.9](#)): Bei hohen Temperaturen, im Bereich oberhalb von circa -15°C , schrumpften Zellen ohne Frierschutzmittel zunächst stark, während mit höheren anfänglichen Frierschutzmittelkonzentrationen dieses Schrumpfen geringer ausfällt. Bei höheren anfänglichen Frierschutzmittelkonzentrationen war bei gegebener Temperatur der Anteil an Eis geringer. Somit existierte ein höherer Anteil an Schmelze, die die Zelle verlassen konnte. Bei tieferen Temperaturen unterhalb von circa -15°C dominierte der Einfluss der temperaturabhängigen hydraulischen Membran-Konduktivität L_p (Gleichung 3.29) maßgeblich den Schrumpfungsprozess. Da die Matlab[®]-Simulationen unter Nutzung des Wassertransportmodells nach Karlsson [91] die experimentell gewonnenen osmotischen Effekte zunächst nicht wiedergaben, wurde das Modell erweitert: Das Implementieren der Temperaturabhängigkeit der Latentwärme nach Dougherty et al. [48] (Gleichung 4.2) in das Modell zeigte nur geringe Auswirkungen auf das osmotische Verhalten. Jedoch lieferten Boyle Van't Hoff-Diagramme unter Konstanthaltung des Faktors R osmotisch inaktive Volumina V_b , die abhängig von der Frierschutzmittelkonzentration waren (vgl. [Tab. 7.1](#)). Die aus den Boyle Van't Hoff-Diagrammen bestimmten Parameter konnten die Matlab[®]-Simulationen verbessern. [Abb. 7.1](#) verdeutlicht den Vergleich zwischen der WTM-Simulation und den experimentellen kryomikroskopischen Ergebnissen.

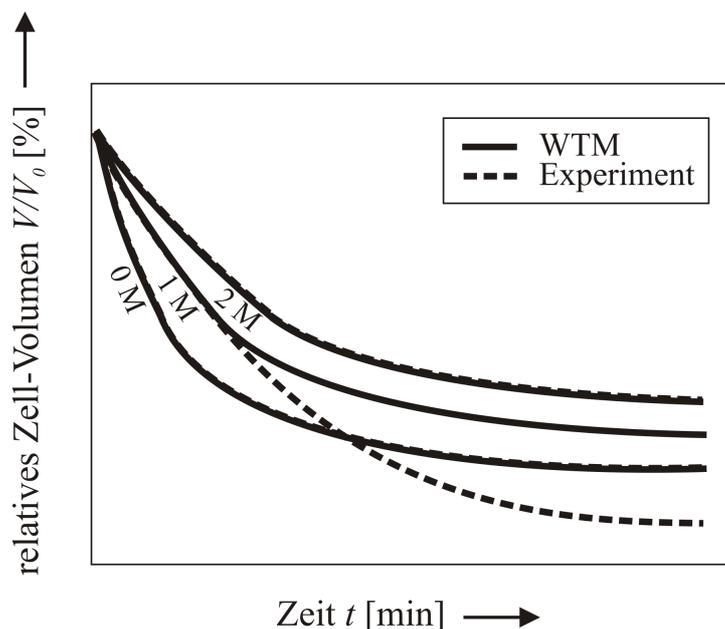


Abb. 7.1:

Prinzipielle Darstellung der Simulationsergebnisse mit dem Wassertransportmodell (WTM) [43] nach [Abb. 4.7](#) im Vergleich zu den experimentellen Ergebnissen am Kryomikroskop (Experiment), vgl. [Abb. 6.9](#) und [Abb. 6.10](#). Im Experiment wurden geringere relative Zellvolumen bei mittleren initialen Frierschutzmittel-Konzentrationen im Bereich von 1 M ermittelt.

8 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

8.1 Zell-Dehydrierung

Für die Forschung im Bereich der Kryokonservierung von Zellen ist eine strategische Vorgehensweise mit theoretischen und experimentellen Untersuchungen wichtig. Dies liegt zum einen darin begründet, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche optimale Frier-Bedingungen zur Erlangung einer optimalen Überlebensrate nach der Kryokonservierung benötigen [132], [135] und es daher kein allgemeingültiges Frierprotokoll gibt. Zum anderen müssten alle nötigen Parameter wie Kühlrate, Heizrate, Lagerungstemperatur, Nukleations-temperatur, Haltezeit, Frierschutzmittelkonzentration, Temperaturverteilung sowie der Zell-zyklus und die Zellzahl in der Probe in ausgedehnten Parameterstudien unabhängig von einander variiert und auf Überlebensrate und Funktionalität überprüft werden. Dies würde zu einem erheblichen experimentellen Aufwand führen. Aus der Literatur sind nur wenige Parameterstudien der Kryokonservierung bekannt, in denen mehrere Parameter, darunter die Kühlrate und die Frierschutzmittelkonzentration, variiert wurden [149], [24], [27]. Deswegen sind in vielen veröffentlichten Studien bei gegebenem Zelltyp die Informationen über ein optimales Frierprotokoll aufgrund fehlender Parameterstudien nicht vorhanden. Aus diesem Grund wurde in jenen Studien vermutlich an nicht optimalen Frierprotokollen geforscht. Im Gegensatz dazu waren zu Beginn dieser Arbeit die optimalen Frierprotokolle von humanen Endothelzellen (HPMEC) bereits bekannt, wobei das Optimum der Überlebensrate mit einer Me_2SO -Frierschutzmittelkonzentration von 5 Vol.-% (0,7 M) bei einer Kühlrate von 5 K/min liegt [80].

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird die erste Hypothese aufgestellt, dass bei der Kryokonservierung von Zellen unter optimalen Parametereinstellungen die Zellen extrem dehydrieren und dabei hohe Zell-Überlebensraten erreichen. Hierzu veranschaulicht [Abb. 8.1](#) in einem schematischen Modell das Dehydrieren einer Zelle bei -30°C ⁶ unter verschiedenen Me_2SO -Konzentrationen mit 0 M (a), ~ 1 M (b) und ~ 3 M (c). Ohne Frierschutzmittel ist das Zell-Volumen relativ groß und die Zellmembran bleibt relativ hydriert (Flüssig-Phase). Im Vergleich zu den Bedingungen ohne Frierschutzmittel schrumpft die Zelle mit mittleren Konzentrationen an Frierschutzmitteln stärker beim Einfrieren, die Dehydratation der Membran ist ausgeprägter (Gel-Phase) und es kommt zur Porenbildung (b). Bei sehr hohen

⁶ Es wird angenommen, dass Zellen während der Kryokonservierung beim Kühlen unterhalb von -30°C nur geringe Volumenänderung erfahren, (vgl. [Abb. 6.9](#)).

Konzentrationen an Frierschutzmitteln ist das Zell-Volumen vergrößert und die Membran wirkt aufgrund einer Desintegration einzelner Phospholipide nicht mehr als Barriere zwischen Intra- und Extrazellularraum und die Porenbildung ist stärker ausgeprägt (c).

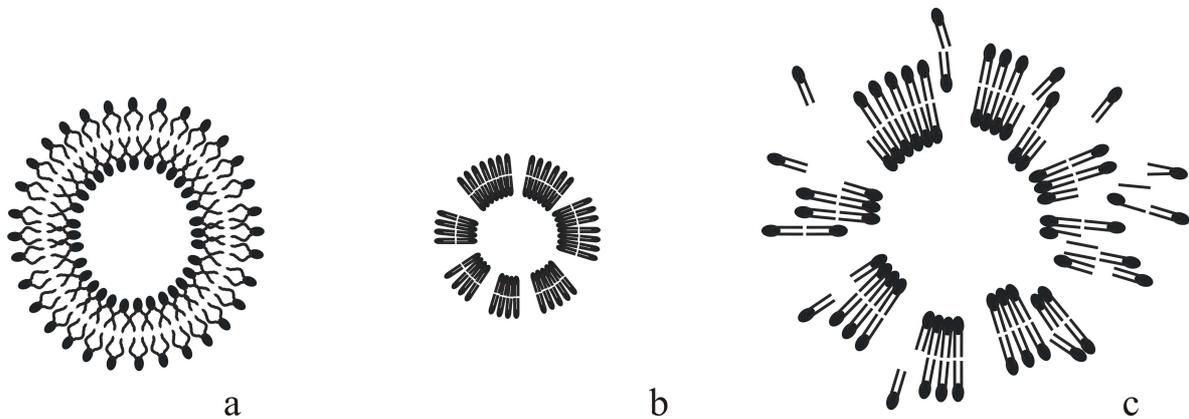


Abb. 8.1: Schematisches Modell von Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Me₂SO bei -30°C: Zellmembran ohne Me₂SO (a), mit mittleren Me₂SO-Konzentrationen von ungefähr 1 M Me₂SO (b) und mit sehr hohen Me₂SO-Konzentrationen (c); nach Spindler et al. [185].

Unterstützt wird diese Hypothese von mehreren veröffentlichten Studien: Im ternären System DPPC-Me₂SO-H₂O wurde mit Hilfe der Röntgenbeugung, der Neutronen-Kleinwinkelstreuung und der DSC gezeigt, dass Me₂SO den intermembranen Raum dehydriert [98]. Auf isolierte synaptische Plasmamembranen wirkten Konzentrationen von 4 bis 10 Vol.-% Me₂SO verdichtend [141]. An wässrigen Lösungen mit DPPC-Liposomen wurden DSC-Untersuchungen durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass an die polaren Kopfgruppen der Phospholipide gebundenes Wasser gefrieren kann [31]. Nach der Sandborn-Theorie, die sich auf elektronenmikroskopische Untersuchungen stützt, kommt es in der Zellmembran aufgrund von Me₂SO zur Porenbildung und schließlich zu einer weiteren Verteilung von Me₂SO in das Zytoplasma [97].

Bisherige theoretische Simulationen des zeitlichen Zell-Volumens beim Einfrieren $V(t)$ haben die Effekte bei mittleren CPA-Konzentrationen nicht mitberücksichtigt. Pegg et al. berechneten das zeitliche Volumen $V(t)$ von kornealen Endothelzellen während des Einfrierens mit Me₂SO-Konzentrationen zwischen 0 und 2 M. Danach sank die anfängliche Steigung von $V(t)$ bei höheren Me₂SO Konzentrationen, was mit den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 6 übereinstimmt (vgl. [Abb. 6.9](#)). Jedoch war das Endvolumen, das die Zellen bei

tiefen Temperaturen erreichten, mit höheren Me₂SO-Konzentrationen höher [150]. Die existierenden theoretischen Modelle sind hochentwickelt [42], [91], können aber bisher nicht das extreme Schrumpfen bei mittleren Frierschutzmittelkonzentrationen beschreiben.

Weitere Anhaltspunkte, die die Hypothese unterstützen, liefern theoretische Untersuchungen verschiedener Forschergruppen: Mittels molekularer Simulation wurde der molekulare Mechanismus von Me₂SO auf Zellmembranen beschrieben, inklusive der Bildung von Poren bei mittleren Me₂SO Konzentrationen [145] und drei konzentrationsabhängigen Wirkmechanismen zwischen 0 und 40% Me₂SO: Diese Simulationen wurden im DPPC-Me₂SO-H₂O-System durchgeführt und konnten zeigen, dass bei niedrigen Me₂SO-Konzentrationen eine laterale Expansion und Verringerung der Membran-Dicke erfolgt, bei mittleren Me₂SO-Konzentrationen die Membran-Dicke weiter abnimmt und es zur Porenbildung in Membranen kommt und bei hohen Konzentrationen die Membranen zerstört werden [68].

Eine wesentliche Erkenntnis der Ergebnisse ist, dass eine extreme zelluläre Dehydrierung beim Einfrieren mit optimaler Kühlrate und optimaler CPA-Konzentration mit einer maximalen Überlebensrate verbunden ist. Dies steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Mazur et al. [132], [135], die den Parameter Kühlrate variierten und schlussfolgerten, dass mittlere Kühlraten bei mäßiger Dehydrierung zur maximalen Überlebensrate führen. Abb. 8.2 skizziert in einem dreidimensionalen Diagramm eine hypothetische Abhängigkeit der Überlebensrate von der Kühlrate und der Frierschutzmittelkonzentration basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit [182], [186], und kombiniert mit anerkannter Literatur [132], [118]. Das Maximum der Überlebensrate ist in diesem Diagramm vereinfacht als Scheitelpunkt einer Fläche dargestellt, die von durchgezogenen Linien umrandet ist. Die durch punktierte Linien aufgespannte Fläche zeigt die von der Frierschutzmittelkonzentration unabhängigen Verhältnisse. Eine Erhöhung der Überlebensrate um b erfolgt bei mittleren CPA-Konzentrationen und eine Verbreiterung des Bereichs h erfolgt bei höheren CPA-Konzentrationen. Die Krümmung der Fläche kann durch die Überlagerung von Schädigungsmechanismen beschrieben werden, die die Überlebensrate verringern: Schädigungen treten bei niedrigen Kühlraten aufgrund von Lösungseffekten (*Lösung*) auf und bei hohen Kühlraten durch intrazellulär verbleibendes Wasser, das im Laufe des Kryokonservierungsvorganges, des Kühlens oder des Erwärmens, gefriert (*IIF*). Während ohne Frierschutzmittel die Wirkung der Kälte auf die Überlebensrate diskutiert wurde [193], [49] (*Kälte*), wirken höhere CPA-Konzentrationen zell-toxisch [183] (*Toxizität*).

- Die Anwesenheit von Membran-permeierede CPA erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine intrazelluläre Eiskristallbildung (IIF) [45], [66]
- Höhere Kühlraten führen zu kleineren Eiskristallen beim Einfrieren [155]
- Intrazelluläres Eis kann bei niedrigen Kühlraten nicht-schädigend sein [66]
- Bei der optimalen Kühlrate ist die Wahrscheinlichkeit für eine intrazelluläre Eiskristallbildung 50% [198]
- Membran-permeierede CPA verhindern Lösungseffekte [66]
- In Abwesenheit von CPA werden Zellen durch Kälte geschädigt [66]

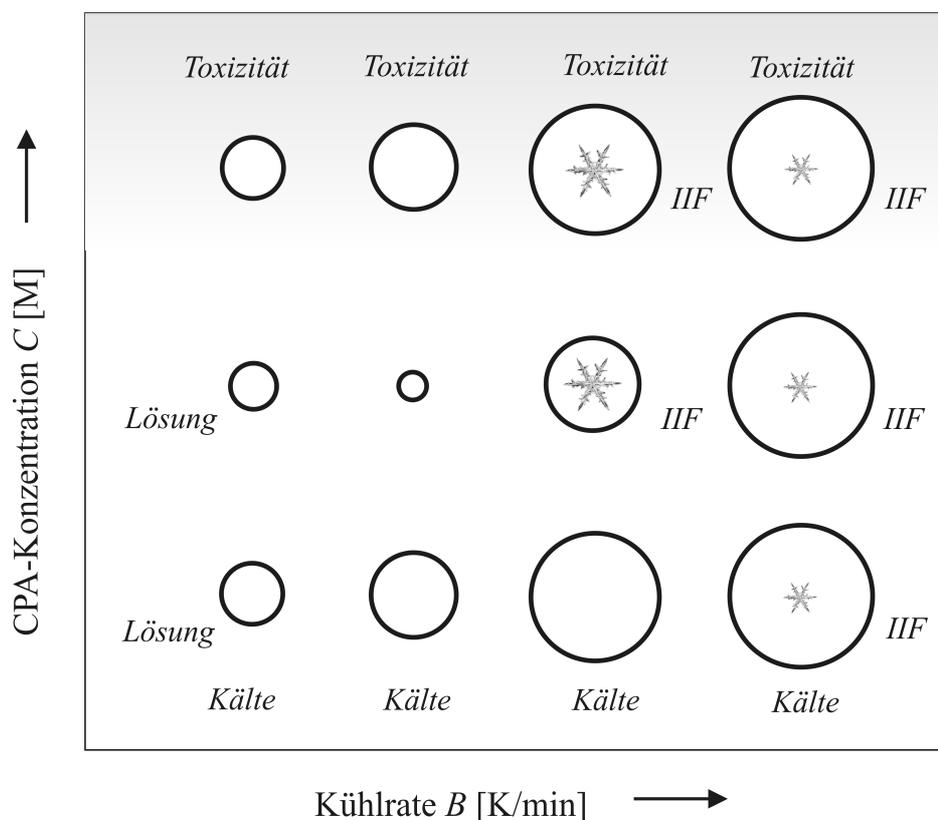


Abb. 8.3: Schematisches Modell des osmotischen Verhaltens von Zellen in Abhängigkeit von der CPA-Konzentration und der Kühlrate bei -30°C . Schematisch dargestellt sind Zellen mit unterschiedlichen Volumina (Kreise) und mit unterschiedlichen großen mittleren intrazellulären Eiskristallen. Außerdem sind die jeweiligen Schädigungsmechanismen eingetragen: Kälte-Einwirkung (*Kälte*), Lösungseffekte (*Lösung*), intrazelluläre Eiskristallbildung (*IIF*) sowie die CPA-Toxizität (*Toxizität; Grauverlauf*). Das Modell veranschaulicht, dass bei mittleren CPA-Konzentrationen und mittleren Kühlraten Zellen in Abwesenheit von intrazellulärem Eis extrem schrumpfen und dabei keine Schädigungsmechanismen vorliegen. Anmerkung: Das Modell gilt nur für Membran-permeierende Frierschutzmittel.

Eine Erklärung, warum es nach [Abb. 8.3](#) bei extremer Dehydrierung bei mittleren Frierschutzmittelkonzentrationen zu einer geringen Wirkung von Lösungseffekten (engl.: solution effects) kommt, kann wie folgt beschrieben werden: Obwohl Lösungseffekte in der Kryokonservierung bisher relativ unverstanden sind [66], [70], ist bekannt, dass sie konzentrations-, zeit- und temperaturabhängig sind [157]. Zwar wird eine stärkere zelluläre Dehydrierung eine stärkere Aufkonzentration von Salzen hervorrufen, jedoch wird eine geringere Einwirkzeit von Salzen bei höheren Kühlraten dem Schädigungsmechanismus entgegen wirken.

8.2 Extrazelluläre Eiskristallbildung

Beim Einfrieren von Zellsuspensionen schwankt die spontane Nukleationstemperatur T_n beträchtlich, woraus sich die Notwendigkeit zur aktiven Kontrolle der Nukleationstemperatur ergibt, die zu einer konstant hohen Zell-Überlebensrate führen kann. Kryomikroskopische Untersuchungen an humanen mesenchymalen Stammzellen ergaben, dass die Nukleationstemperatur ohne Me_2SO im Bereich von $-15,8^\circ\text{C}$ bis $-23,5^\circ\text{C}$ und mit 10 Vol.-% Me_2SO von $-21,8^\circ\text{C}$ bis $-24,7^\circ\text{C}$ schwankte [64]. Von ähnlich hohen Variationen der spontanen Nukleationstemperatur zwischen $-11,5^\circ\text{C}$ und $-17,5^\circ\text{C}$ wurde in Studien mit wässrigen HES-Lösungen berichtet [156]. Den Einfluss der Nukleationstemperatur auf die Zell-Überlebensrate wurde in einem invertierten U-förmigen Verlauf bereits dokumentiert (vgl. [Abb. 3.9](#)) [157] und dieser Verlauf wurde durch die Ergebnisse der Untersuchungen mit HPMEC-Zellen bestätigt (vgl. [Abb. 6.3](#), [Abb. 6.4](#), [Abb. 6.23](#), [Abb. 6.24](#) und [Tab. 6.1](#)). Zusätzlich werden die Erkenntnisse dadurch erweitert, da die Frierschutzmittelkonzentrationen variiert wurden und deshalb eine Abhängigkeit der maximalen Überlebensrate von der Nukleationstemperatur und Frierschutzmittelkonzentration gefunden wurde (Abschnitt 6.4.2).

Hieraus folgt die zweite Hypothese, dass durch die aktive Kontrolle einer optimalen Nukleationstemperatur die Frierschutzmittelkonzentration verringert werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine hohe Zell-Überlebensrate mit der optimalen Kühlrate von 5 K/min und der optimalen Frierschutzmittelkonzentration von 5% Me_2SO erzielt. Durch die Kontrolle eines zusätzlichen, dritten Prozessparameters, der Nukleationstemperatur, wurde ebenfalls eine hohe Zell-Überlebensrate erzielt. Bei $T_n = -5^\circ\text{C}$ konnte allerdings die Frierschutzmittelkonzentration auf 2,5% Me_2SO verringert werden (vgl. [Abb. 6.24](#)). Für die Kryo-

konservierung ist diese Möglichkeit der CPA-Reduzierung im Hinblick auf die konzentrationsabhängigen Effekte von Me_2SO auf Zellen bedeutsam: Obwohl Me_2SO eine sehr geringe Toxizität aufweist [205], [213], ist seine differenzierende Wirkung bekannt [65], [123]. Die Möglichkeit der CPA-Reduktion wird aus diesem Grund in der Kryokonservierung von Stammzellen bedeutsam sein.

8.3 Intrazelluläre Eiskristallbildung

Eine intrazelluläre Eiskristallbildung, die unter dem Kryomikroskop in der Regel durch eine intrazelluläre wandernde Phasenfront und anschließende zelluläre Verdunkelung detektierbar ist, geschieht bei niedrigen Konzentrationen an Frierschutzmitteln als Folge einer extrazellulären Eiskristallbildung. Diese Annahme ist in der Literatur weit verbreitet [66], [176], [190] und konnte in dieser Arbeit durch kryomikroskopische Frier-Untersuchungen mit HPMEC-Zellen bestätigt werden. Im Gegensatz dazu kann bei sehr hohen Konzentrationen an Frierschutzmitteln, wie in Vitrifikationslösungen, eine intrazelluläre Eiskristallbildung auch ohne extrazelluläre Eiskristallbildung als Folge einer homogenen intrazellulären Nukleation erfolgen [59]. Ebenfalls wurde berichtet, dass an luftgetrockneten Eiern der Taufliege *Drosophila melanogaster* intrazelluläres Eis in Abwesenheit von extrazellulärem Eis auftrat [142]. Da die hier untersuchten CPA-Konzentrationen im Bereich von 0 M bis 3 M liegen und entsprechend hohe Nukleationstemperaturen besitzen, ist hier eine homogene intrazelluläre Nukleation auszuschließen (vgl. Abschnitt 3.1.2).

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit der Hochgeschwindigkeitskamera (Abb. 6.6) liefern neue Hinweise für die Validität des SCN-Modells (vgl. Abschnitt 3.2.2). Nach dem SCN-Modell erfolgt in einer Zellsuspension durch die Anwesenheit von extrazellulärem Eis eine Veränderung der Plasmamembran aufgrund von mechanischen, chemischen, thermischen, elektrischen oder ionischen Effekten, die dann eine intrazelluläre Nukleation auslösen [16], [197]. Der Ort, an dem das extrazelluläre Eis erstmalig „in unmittelbarer Nähe“ zur Zelle lokalisiert ist, kann dort die Ursache für eine intrazelluläre Eiskristallbildung sein. Die kryomikroskopischen Ergebnisse mit HPMEC-Zellen verdeutlichen, dass die Eiskristallbildung immer am Rand einer Zelle beobachtbar waren (vgl. Abschnitt 3.1.3). Im Gegensatz wurde eine zentrale intrazelluläre Nukleation mit anschließender Eiskristallbildung zum Rand einer Zelle hin nicht beobachtet und eine durch das Volumen katalysierte Nukleation erscheint

nicht bestätigt (VCN-Modell). Es ist zu vermuten, dass ältere Zellen mit instabiler Plasmamembran oder membran-intakte Zellen vorrangig unter dem Winkel $\alpha = 180^\circ$ intrazellulär nukleierten. In diesem Fall stellte die Plasmamembran keine permanente Barriere zwischen intra- und extrazellulärem Raum dar und eine intrazelluläre Nukleation konnte ungehindert erfolgen.

Ein relativ hoher Anteil an Zellen erfuhr während der Einfrier- und Auftau-Versuche vor allem bei optimal gewählten Prozessparametern bei unkontrollierter Nukleation eine intrazelluläre Eiskristallbildung: Dies wurde an mesenchymalen Stammzellen mit dem Frier-schutzmedium Biofreeze[®] von Freimark et al. [64] und an HPMEC-Zellen an allen kryomikroskopischen Untersuchungen mit 5 K/min und 5% Me₂SO bei spontaner Nukleation in dieser Arbeit festgestellt (vgl. [Tab. 6.1](#), [Abb. 6.7](#)).

Das zentrale Dogma der Kryobiologie, dass eine intrazelluläre Eiskristallbildung per se schädlich ist, scheint daher Widersprüche zu beherbergen: Mazur et al. beschrieben, dass beim Einfrieren von Oozyten der Maus unter Variation der Kühlraten zwei verschiedene Arten intrazellulären Eises entstehen kann: letales IIF und nicht-letales (engl.: rescuable) IIF. Hierbei passierten die Oozyten unterhalb des Medianwertes der intrazellulären Nukleations-temperatur die sogenannte Nukleationszone und beim langsamen Einfrieren mit ~ 2 K/min erreichten sie den nicht-letalen IIF Bereich [66], [133]. Während Mazur et al. eine feste Grenz-Temperatur als Beginn der Nukleationszone definierten, berechneten Karlsson et al. für Hepatozyten diese Grenze der Nukleationszone in einem weiten Temperaturbereich zwischen -27°C und -52°C [90]. Diese Berechnungen ergaben, dass die Grenz-Temperatur der Nukleationszone von der Kühlrate abhängig ist. Wolkers et al. veröffentlichten in einem Diagramm Simulationsergebnisse von humanen Krebszellen der Prostata, nach denen es bei mittleren Nukleationstemperaturen von -6°C zu hohen Überlebensraten von 60% führte und dabei gleichzeitig ein sehr hoher Anteil an intrazellulärer Eiskristallbildung bestand [208]. Nach Toner et al. ist die Kühlrate beim Einfrieren von Zellen optimal, wenn 50% der Zellen eine intrazelluläre Eiskristallbildung erfahren [1], [198]. Neuere unveröffentlichte Studien zweifeln sogar die Schädlichkeit der intrazellulären Eiskristallbildung an [84].

Die Ergebnisse der kryomikroskopischen Untersuchungen an Zellpellets liefern Hinweise darüber, dass diese Zellen einen hohen Anteil an intrazellulärem Eis während des Einfrierens bildeten ([Abb. 6.7](#)) und sich aufgrund ihrer hohen Zelldichte und ihres geringen extrazellulären Wasser-Anteils osmotisch anders verhalten als Zellen in Suspension. Diese Ergebnisse werden von anderen Forschergruppen bestätigt: Aus einer Studie mit Hamster-Fibroblasten folgerten Acker et al., dass die zelluläre Interaktion während des Einfrierens eine

intrazelluläre Eiskristallbildung maßgeblich beeinflusst. Sie zeigten, dass sowohl das Substrat von adhärennten Zellen, als auch der Zell-Zell-Kontakt die Temperatur für eine intrazelluläre Eiskristallbildung signifikant erhöht [2], [3]. Katkov et al. beschrieben, dass die Zellen in einer gefrorenen Zellsuspension überlebten, die in der solidifizierten Lösung einzeln zwischen dem Eis eingeschlossen waren [96]. Aus diesem Grund ist vor der Kryokonservierung der Arbeitsschritt der Resuspendierung von Zellen in Suspension notwendig [189].

8.4 Einfluss der Untersuchungsmethoden auf die Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurden mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erforscht und führten zu gleichen Schlussfolgerungen und somit zur Bestätigung der ersten Hypothese, dass bei der Kryokonservierung von Zellen unter optimalen Parametereinstellungen Zellen extrem dehydrieren (vgl. Abschnitt 8.4). Hierbei hatte die Untersuchungsmethode mittels Kryomikroskopie den Vorteil, dass die Dehydrierung an Einzelzellen beobachtbar war (vgl. Abschnitt 5.1.2). Die beim Gefrieren durch Eiskristallbildung entstehende Inhomogenität der Probe wirkte sich grundsätzlich störend auf die kryomikroskopische Messergebnisse aus, indem sie die optischen Abbildungen durch Dichteunterschiede und Außerfokuslicht verschlechterten [182]. Nach Kontroll-Messungen an $\sim 10 \mu\text{m}$ großen Glas- und Latex-Beads wurde jedoch diese Ungenauigkeit qualitativ als vernachlässigbar eingestuft und deshalb die Bestimmung des Zell-Volumens ermöglicht [186]. Mittels der FTIR-Methode wurde das osmotische Verhalten von $\sim 10^6$ Zellen in einem Zellpellet parallel bestimmt. Eine gute Korrelation zwischen den beiden Messsystemen wurde durch Studien der Zell-Dehydrierung und der Membran-Dehydratation an Fibroblasten der Maus kürzlich veröffentlicht, wobei hierbei zwischen gebundenem Wasser und osmotisch aktivem Wasser unterschieden wurde [8], [9].

Die Nukleationsexperimente mit HPMEC-Zellen konnten durch die Entwicklung eines Frierblocks für das automatische Einfriergerät CM2000 und eines Nukleators für das Kryomikroskops automatisiert und vereinfacht werden (vgl. Kapitel 5). Dies ermöglichte eine hohe Anzahl an Wiederholungsmessungen unter verschiedenen Frier-Bedingungen bei konstanten Parametereinstellungen [186].

9 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassung:

Gegenwärtig ist die Kryokonservierung die einzige Methode, die eine Langzeitlagerung von Zellen und Geweben ermöglicht und dabei deren Morphologie, Funktionalität und Vitalität erhält. Bei den kryogenen Lagerungstemperaturen dieser biologischen Proben kommen unterhalb der Glasübergangstemperatur von H_2O bei $-135^\circ C$ die Stoffwechselfvorgänge praktisch zum Erliegen und eine Alterung der Proben ist vernachlässigbar. Obwohl die kryogene Lagerung bereits für eine Vielzahl von biologischen Proben in kleinsten Volumina in nationalen Kryobanken im klinischen und industriellen Umfeld etabliert ist, können größere Probengeometrien im Bereich von Millimetern aufgrund von verschiedenen Schädigungsmechanismen bisher nicht erfolgreich kryokonserviert werden.

Generell dient die Forschung in der Kryokonservierung der Erzielung maximaler Überlebensraten der biologischen Proben nach dem Einfrier-Auftau-Vorgang. Darüber hinaus wird angestrebt, das zelluläre Verhalten während der Kryokonservierung vorhersagen zu können. Bei der Verfahrensgestaltung existiert jedoch eine Reihe von Prozessparametern. Dazu gehören die Kühlrate, Heizrate, Lagerungstemperatur, Nukleationstemperatur, Haltezeit, Frierschutzmittelkonzentration, Temperaturverteilung sowie der Zellzyklus und die Zellzahl in der Probe. Diese Prozessparameter sind voneinander abhängig und müssen für den jeweiligen Zelltyp optimiert sein. Bisher wurden nur wenige systematische Parameterstudien an verschiedenen Zelltypen experimentell [24], [27], [149] und theoretisch [43], [91], [163] durchgeführt⁷. Außerdem wurde bisher die Nukleationstemperatur als Prozessparameter nur in wenigen Studien berücksichtigt [157].

Zu Beginn dieser Arbeit war das Optimum der Kühlrate und der Konzentration an Frierschutzmittel des untersuchten Zelltyps, humanen Endothelzellen der Lunge (HPMEC-Zellen), bereits bekannt: Die optimale Kühlrate betrug 5 K/min und die optimale Frierschutzmittelkonzentration wurde mit 5 Vol.-% Me_2SO erreicht [80]. Aufgrund dieser Vorkenntnisse wurden in dieser Arbeit die kryobiologischen Effekte der HPMEC-Zellen unter dem Einfluss

⁷ Eine Kooperation zwischen vornehmlich experimentell und theoretisch arbeitenden Kryobiologie-Forscherguppen wurden hierfür aufgebaut [40]: Projektarbeit von Frau L. Heidelberg in Kanada (Prof. J.A.W. Elliott, Department of Chemical & Materials Engineering, Faculty of Engineering, University of Alberta, Canada).

der Nukleationstemperatur und der Konzentration an Frierschutzmitteln in der Nähe dieses Parameter-Optimums erforscht.

Zwei Hypothesen wurden aufgestellt: Erstens, bei optimalen Frierbedingungen schrumpfen Zellen während der Kryokonservierung extrem und zweitens, die Konzentration an Frierschutzmittel kann unter der Kontrolle des Prozessparameters Nukleationstemperatur verringert werden. Für die Validierung der Hypothesen wurden verschiedene Messverfahren genutzt. Zunächst wurden die in diesen Methoden genutzten Probengefäße auf ihre Temperaturverteilung während des Gefriervorganges untersucht. Dies ermöglichte die Abschätzung, ob die Probengeometrie als Prozessparameter Einfluss auf einen späteren Vergleich der verschiedenen Untersuchungsarten hat. Hierzu wurden Finite-Elemente-Simulationen mit SolidWorks[®] durchgeführt, die die Temperaturverteilung der Probengefäße ermittelten und eine homogene Wärmeabfuhr von den wässrigen Proben nachwies. Damit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Messmethoden trotz unterschiedlicher Probengeometrien verglichen werden können.

Für eine Simulation des osmotischen Verhaltens von HPMEC-Zellen mittels Matlab[®] mussten zunächst die grundlegenden osmotischen Parameter ermittelt werden. Diese Zell-Parameter wurden experimentell mit Hilfe eines Coulter Counters gemessen. Somit konnte, nach der Erstellung eines neuen Simulationsmodells (Wassertransportmodell [42]), das osmotische Verhalten in Abhängigkeit verschiedener Frierschutzmittel-Konzentrationen berechnet werden. Die Simulations-Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen [150]. Es zeigt sich jedoch, dass das gängig genutzte Wassertransportmodell Limitierungen hinsichtlich der Genauigkeit beim optimalen Frierprotokoll aufweist.

Um den Wassertransport von Zellen während der Kryokonservierung unter optimalen Prozessparametern experimentell zu erforschen, wurde die Dehydratation der Zell-Membranen der HPMEC-Zellen untersucht. Hierzu wurde die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR) im Infrarotspektrum im H₂O-Band ($\sim 2300\text{ cm}^{-1}$), im CH₂-Band ($\sim 2850\text{ cm}^{-1}$) und im Amid-I-Band ($\sim 1620\text{ cm}^{-1}$) während des Kühlens und Heizens analysiert. Zusätzlich wurde die Dehydrierung der Zellen während des Einfrier-Auftau-Vorganges, durch die optische Analyse des Zell-Volumens und mit Hilfe der Kryomikroskopie bestimmt. Zur Kontrolle der Nukleationstemperatur wurde ein *Nukleator* konstruiert, bei dem ein Flüssigstickstoff-gekühlter Metallstab mittels einer Schrittmotorsteuerung bei einer vorgegebenen Nukleationstemperatur die mikroskopischen Proben automatisch nukleieren kann. Die Messergebnisse beider Methoden, der FTIR sowie der

Kryomikroskopie zeigen, dass die erste Hypothese für das HPMEC-Modell bestätigt werden konnte: Unter Variation der Konzentration an Frierschutzmitteln, mit Me₂SO und Ethylenglycol, war die spektroskopisch ermittelte Dehydratation von Zell-Membranen am stärksten unter Nutzung von mittleren Frierschutzmittelkonzentrationen ausgeprägt. Dieser konzentrationsabhängige Effekt verstärkte sich in Anwesenheit von extrazellulärem Eis und zu tieferen Temperaturen hin. Die kryomikroskopischen Zell-Volumen Untersuchungen ergaben bestätigende Ergebnisse, wobei mittlere Me₂SO- und Ethylenglycol-Konzentrationen zu einem extremen Schrumpfen der HPMEC-Zellen führten. Somit konnte zum ersten Mal und mit unterschiedlichen Messmethoden eindeutig gezeigt werden, dass Zellen beim Einfrieren unter optimalen Bedingungen extrem schrumpfen.

Für die Verifikation der zweiten Hypothese, der Fragestellung, ob durch die Kontrolle der Nukleationstemperatur die Frierschutzmittel-Konzentration verringert werden kann, wurde ein *Frierblock* entwickelt. Gekühlt in einem Einfrierautomaten erlaubt dieser die Kontrolle der Nukleationstemperatur von bis zu acht wässrige Proben in kommerziellen Kryoröhrchen. Die Nukleation wird hierbei durch eine sekundäre Nukleation mittels Peltier-Elementen ausgelöst. HPMEC-Zellen wurden mit diesem Frierblock unter kontrollierter Variation der Nukleationstemperatur und Konzentration an Frierschutzmitteln kryokonserviert und ihre Überlebensrate mittels Membranintegritätstests (ViCell[®]) bestimmt. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden parallel Zell-Untersuchungen am Kryomikroskop durchgeführt, wobei die Vitalität dieser Zellen am Fluoreszenzmikroskop mittels Calcein-AM und Ethidiumhomodimer-Färbung bestimmt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen beweisen erstmalig, dass das ubiquitär eingesetzte und toxisch wirkende Frierschutzmittel Me₂SO unter Nutzung einer hohen Nukleationstemperatur (~-5°C) bei gleichen Überlebensraten geringer dosiert werden kann: Unter Variation der Frierschutzmittelkonzentration führte eine Verringerung der Me₂SO-Konzentration von 5 Vol.-% auf 2,5 Vol.-% unter Erhöhung der Nukleationstemperatur von -12°C auf -5°C zu einer vergleichbaren Membran-Integrität von ~90%. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse die Notwendigkeit der Kontrolle der Nukleationstemperatur aufgrund der sinkenden Überlebensrate bei spontaner Nukleation und tiefen Nukleationstemperaturen. Die Kontrolle der Nukleationstemperatur erhöhte grundsätzlich die Überlebensrate der HPMEC-Zellen nach der Kryokonservierung, wobei Membran-Integritätstests ein Optimum der Nukleationstemperatur von -12°C ergaben. Damit decken sich diese Resultate mit denen von Petersen [157], der erstmalig einen parabelförmigen Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der Nukleationstemperatur nachwies.

Unter welchen Bedingungen eine intrazelluläre Eiskristallbildung auftritt, wurde insbesondere in der Nähe des Parameter-Optimums gemessen. Hierfür kam die Kryomikroskopie zum Einsatz, insbesondere wurde hier zusätzlich eine Hochgeschwindigkeitskamera mit der Bildwiederholungsrate von 1000 fps eingerichtet. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein Teil der Zellen (17,9%) in Abwesenheit von membran-permeierenden Frierschutzmitteln während des Einfriervorganges ein Anschwellen durch das sogenannte „freeze-induced swelling“ (FIS) erfuhren. Eine Analyse des Einflusses der extrazellulären Eiskristallfront auf die intrazelluläre Nukleation ergab, dass bei dem Auftreten der intrazellulären Eiskristallbildung eine Richtungsabhängigkeit bei $\alpha = 180^\circ$ von der extrazellulären Eiskristallbildung bestand. An HPMEC-Zell-Pellets wurde gezeigt, dass diese trotz hoher intrazellulärer Eiskristallbildung unter dem Kryomikroskop eine hohe vergleichbare Membranintegrität und Vitalität nach einer 24-stündigen Rekultivierung besaßen [185].

Aufbauend auf anerkannten veröffentlichten Forschungsergebnissen [90], [135], [145] wurde ein neues Modell entwickelt (vgl. [Abb. 8.1](#), [Abb. 8.2](#) und [Abb. 8.3](#)), [185] das das konzentrationsabhängige Verhalten von Zellen während des Einfrierens beschreiben kann. Hierbei wurden die dabei auftretenden Schädigungsmechanismen mitberücksichtigt.

Ausblick:

Die Suche nach dem optimalen Frierprotokoll für einen bestimmten Zelltyp erscheint im Hinblick auf die Vielfalt der zu optimierenden Prozessparameter aufwändig. Mögliche zukünftige Strategien zur Findung von optimalen Frierprotokollen können naturwissenschaftlich, mathematisch oder empirisch sein: In dieser Arbeit wurden mit den aufgestellten Hypothesen grundlegende Prinzipien erarbeitet und damit eine ingenieur- und naturwissenschaftliche Herangehensweise verfolgt. Denkbar sind auch zukünftige mathematische Modelle, die optimale Frierprotokolle durch Simulation ermitteln können. Erste Forschungsergebnisse zu solchen Modellen, die auf thermodynamischen Virialgleichungen basieren, sind bereits veröffentlicht worden [163]. Eine weitere Strategie ist eine empirische Herangehensweise: Durch Reihenuntersuchungen von Kombinationen der Prozessparameter in mikrofluidischen Aufbauten, wie mit der Microwell Array Zytometry, ist ein hoher Automatisierungsgrad und eine Parallelisierung von Messvorgängen möglich [22], [23], [169].

Eine alternative Methode der Kryokonservierung von biologischen Proben besteht in der Anwendung verschiedener hochdosierter Frierschutzmittel und Eisblocker mit dem Ziel, die

Eiskristallbildung durch eine sogenannten Vitrifikation komplett zu verhindern. Eines der Hauptprobleme ist hierbei jedoch die konzentrationsabhängige Toxizität der eingesetzten Frierschutzmittel. Durch Kombination von mehreren gering-konzentrierten Frierschutzmitteln und durch Einsatz von Toxizitäts-Neutralisatoren wird die Gesamt-Toxizität der hierbei zum Einsatz kommenden sogenannten Vitrifikationslösungen gering gehalten [60]. In der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet wird ein universelles Vitrifikations-Protokoll angestrebt, das für alle Zelltypen gleichermaßen anwendbar ist [81].

Diese Strategien zeigen, dass die Kryokonservierung ein zunehmend interdisziplinäres Gebiet wird. Nur wenn bei der Kryokonservierung sowohl *extrinsisch* optimale verfahrenstechnische Bedingungen, als auch *intrinsisch* optimale biologische Bedingungen vorherrschen, können hohe Zell-Überlebensraten erreicht werden.

10 ANHANG

10.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

Tab. 10.1: Überlebensrate von verschiedenen kryokonservierten Zelltypen mit entsprechenden Angaben über das genutzte Frierprotokoll, Probengefäß und Literaturquellenangaben.

| Zelltyp | Überlebensrate nach Kryokonservierung | Frierprotokoll | Probengefäß | Literatur |
|-----------------------------------|---|---|---|------------------------|
| humane Nieren-Epithelzellen, 293T | 89% (S_{rel}) | 1 K/min to -30°C und 5 K/min to -80°C ; 5% Me_2SO ; $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL | 1,5 L Nuc (PC) | [110] |
| humane Keratinozyten | 94% (S_{abs}) | 5 bis 10 K/min (2- stufig); 2,5% Me_2SO ; $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL | - | [24] |
| humane Keratinozyten | 90% (S_{abs} , Monolayer) 80% (S_{rel} , Suspension) 88% (S_{rel} , Monolayer) | 3 K/min; 10 Gew.-% HES; $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL | - | [148], [149] |
| humane primäre Fibroblasen | 97% (S_{rel}) | 1 K/min to -30°C und 5 K/min to -80°C ; 5% Me_2SO ; $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL | 0.5 L Durham (Glas) | [22], [23], [24] |
| humane Adipozyten | 50% | 2 und 10 K/min (2- stufig); 5% Me_2SO | - | [22] |
| HeLa-Zellen | 60% | 1 K/min; 5% Me_2SO | - | [22] |
| CD34+ Zellen | 90% (S_{rel}) | 1 K/min; $T_n = -8^{\circ}\text{C}$ | 4 mm Glasröhrchen | [22], [157] |
| CD34+ Zellen | 88% (92%) | 1 und 5 K/min (2- stufig); 7,5% Me_2SO | Kryoröhrchen (Hemofreeze [®] - Beutel) | [21] |
| humane Erythrozyten | 90% | 350 K/min; 10% bis 40% HES | Blutbeutel / Rippen- kontainer | [22] |
| humane Thrombozyten | 96% | 28 K/min; 1 M Glyzerin und 0,28 M D-Glukose | - | [22] |
| Lymphozyten | 97% | 70 K/min; 10 Vol.-% Me_2SO | - | [22] |

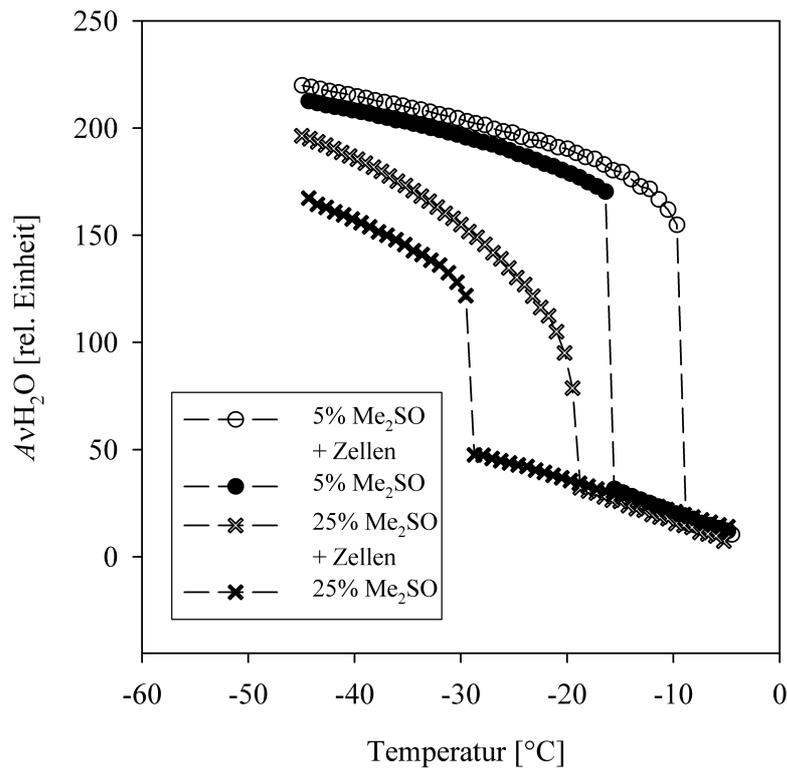


Abb. 10.1: Fläche des H₂O-Bandes im FTIR-Spektrum in Abhängigkeit von der Temperatur beim Kühlen mit 1 K/min mit 5% (Kreise), mit 25% Me₂SO (Kreuze) sowie mit und ohne HMPEC-Zellen. Bei gegebener Frierschutzmittelkonzentration erhöht sich in Anwesenheit von Zellen die Kristallisationskinetik (vgl. Abb. 6.1).

10.2 Probenvorbereitung für Endothelzellen-Experimente

In dieser Arbeit wurden als Zellmodell humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge (human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC) der Linie HPMEC-ST1.6R verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Kirkpatrick zur Verfügung gestellt [108] und wurden im Institut für Mehrphasenprozesse in T75 Zellkulturschalen unter standardisierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ steril kultiviert. Die Zellen befanden sich zwischen den Passagen 30 bis 50. Das Kulturmedium bestand aus DMEM und den Zusätzen 15% FBS, 1% Pen/Strep, Heparin und ECGS (Biochrom, Deutschland) und wurde alle 36 bis 72 Stunden ersetzt. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen 3 Minuten mit vorgewärmten Trypsin (0,25 Vol.-%) abgelöst und 8 Minuten bei 4°C mit 900 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit

500 μL bei $\sim 0^\circ\text{C}$ aufgefüllt. Me_2SO stammte von Carl Roth, EG von Sigma und alle anderen Chemikalien wurden von Biochrom, Deutschland bezogen. Die Frierschutzmittel wurden abgewogen und vorgekühltes Kulturmedium wurde hinzu pipettiert, um die Osmolalität auf den doppelten Wert des gewünschten Wertes einzustellen, von denen schließlich 500 μL tropfenweise auf 500 μL Zellsuspension hinzugefügt wurden. Diese Methode vermied durch einen graduellen Anstieg der Frierschutzmittelkonzentration bis zur gewünschten Osmolalität einen zellulären osmotischen Schock. Die Zellen wurden weiter für 10 Minuten bei $\sim 0^\circ\text{C}$ inkubiert, um eine homogene Verteilung an Frierschutzmitteln in der Probe durch Diffusion zu erlauben [25]. Alle Kontrollversuche wie Zellen ohne Frierschutzmittel wurden ebenfalls für 10 Minuten bei $\sim 0^\circ\text{C}$ inkubiert, um vergleichbare Vorbedingungen zu erhalten.

10.3 Bestimmung der osmotischen Zell-Parameter

10.3.1 Osmolalitätsmessung von Frierschutzmitteln

Zur Messung der Osmolalität von Frierschutzmitteln kam der OSMOMAT 030-D von Gonotec[®] zum Einsatz. Dieser nutzte die Gefrierpunktsdepression von wässrigen Lösungen und bezog sich auf den Gefrierpunkt destillierten Wassers. Die Osmolalität M einer wässrigen Lösung mit Frierschutzmitteln ermittelte sich aus dem Verhältnis der Gefrierpunktsdepression ΔT zur kryoskopischen Konstanten $K = 1,858 \text{ K}\cdot\text{kg}/\text{osmol}$. Zur Kalibrierung wurden 50 μL Gonotec[®]-Kalibrierlösungen verwendet, die eine definierte Osmolalität aufwiesen. Zusätzlich wurde 50 μL bidestilliertes Wasser zur Kalibrierung eingesetzt. Der betriebsbereite und kalibrierte OSMOMAT ist in [Abb. 10.2](#) dargestellt.



Abb. 10.2: Osmometer zur Bestimmung der Osmolalität von Frierschutzmitteln.

10.3.2 Boyle Van't Hoff-Diagramme und osmotisch inaktives Volumen

Boyle Van't Hoff-Diagramme beschreiben den Einfluss osmotisch aktiver Substanzen auf das Zell-Volumen V im eingeschwungenen Zustand. Viele Zellarten verhalten sich in einem bestimmten Bereich in der Nähe ihres isotonen Volumens V_0 als ideale Osmometer. Dies führt zu einer linearen Beschreibung des relativen Zell-Volumens V/V_0 in Abhängigkeit von der normierten reziproken Osmolalität M_0/M [66] mit:

$$\frac{V}{V_0} = \frac{M_0}{M} \left(1 - \frac{V_b}{V_0} \right) + \frac{V_b}{V_0} \quad (10.1)$$

Bei sehr hohen und sehr niedrigen Osmolalitäten treten in der Regel Nichtlinearitäten auf. Zur Bestimmung des osmotisch inaktiven Volumens V_b wird im Boyle Van't Hoff-Diagramm der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate abgelesen und dieser Wert mit dem isotonischen Volumen multipliziert [150].

In dieser Arbeit wurden zur Erstellung von Boyle Van't Hoff-Diagrammen Messungen mit dem Coulter Counter Multisizer 030[®] durchgeführt. Zu Beginn jeder Versuchsreihe war eine

Kalibration des Coulter Counters erforderlich, da bei der Nutzung unterschiedlicher Elektrolytlösungen die Leitfähigkeit und damit das Messprinzip beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurden Elektrolytlösungen mit definierten Osmolalitäten angesetzt, die während der Kalibration und den Versuchsreihen genutzt wurden. 20 mL der Elektrolytlösungen wurden mit 2 bis 4 Tropfen Coulter Counter CCL10[®] Latex-Perlen mit einem Durchmesser von 10 μm gemischt und die Kalibration gestartet. Nach der Probenvorbereitung der HPMEC-Zellen (vgl. Abschnitt 10.2) wurden die Versuchsreihen abgearbeitet (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Die Messergebnisse sind jeweils in einem Boyle Van't Hoff-Diagramm für verschiedene Konzentrationen an NaCl (Abb. 10.3) und an PBS (Abb. 10.4) dargestellt. Aus diesen Diagrammen ließ sich das osmotisch inaktive Volumen für NaCl zu $V_b = 0,23 \cdot V_0$ und für PBS zu $V_b = 0,31 \cdot V_0$ bestimmen.

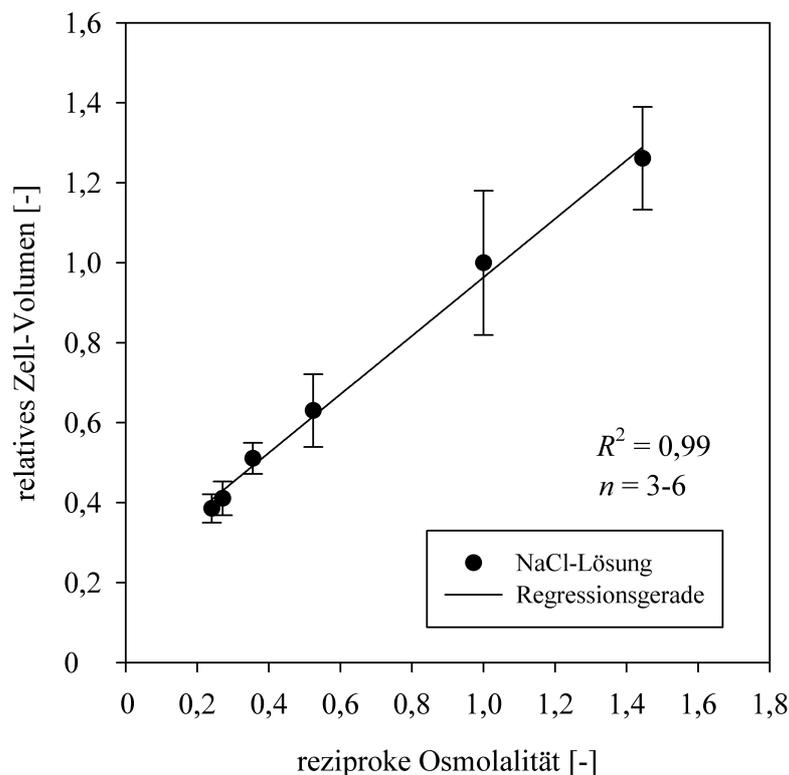


Abb. 10.3: Boyle Van't Hoff-Diagramm von HPMEC Zellen: Relatives Zell-Volumen unter Variation der extrazellulären NaCl-Konzentration (225, 325, 620, 915, 1200, 1360 mosmol/kg H₂O). Mit der zugehörigen linearen Regression $y = 0,73 \cdot x + 0,23$ ergibt sich ein Bestimmtheitsgrad von $R^2 = 0,99$, $n = 3-6$.

Der Einfluss von der Konzentration an Frierschuttmitteln auf das osmotisch inaktive HPMEC-Zell-Volumen V_b wurde ebenfalls mittels des Coulter Counters bestimmt. Hierzu wurden Boyle Van't Hoff-Diagramm für die Membran-permeierenden Frierschuttmittel Dimethylsulfoxid und Ethylenglycol unter Konstanthaltung des R -Wertes⁸ (Gleichung 3.23) erstellt.

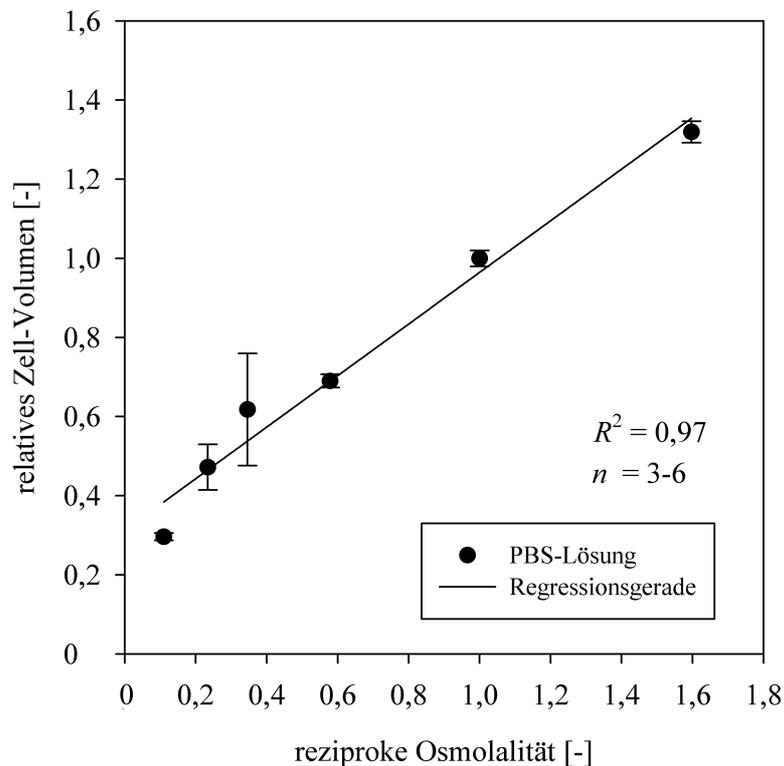


Abb. 10.4: Boyle Van't Hoff-Diagramm von HPMEC Zellen: Relatives Zell-Volumen unter Variation der extrazellulären PBS-Konzentration (206, 329, 569, 951, 1407, 2991 mosmol/kg H₂O). Mit der zugehörigen linearen Regression $y = 0,65 \cdot x + 0,31$ ergibt sich ein Bestimmtheitsgrad von $R^2 = 0,97$, $n = 3-6$. Hieraus ergibt sich $V_b = 0,31 \cdot V_0$.

⁸ Es wird angenommen, dass beim Kühlen einer Zellsuspension im Bereich konstanter R -Werte der wesentliche Anteil des osmotisch aktiven Wassers die Zelle verlässt [146], [217] (vgl. Abb. 6.9).

10.3.3 Hydraulische Konduktivität und Aktivierungsenergie

Für die theoretischen Untersuchungen des osmotischen Verhaltens von HPMEC-Zellen wurden Simulationen mit dem Wassertransportmodell durchgeführt (siehe Kapitel 4). Hierzu mussten dem Modell die hydraulische Konduktivität L_p und die Aktivierungsenergie E_a für diesen Zelltyp als Eingangsparameter bekannt sein [184]. Es wurde eine kryomikroskopische Methode nach Petersen et al. [157] gewählt, nach der eine transiente Volumenänderung von Zellen aufgrund einer abrupten Änderung der extrazellulären Osmolarität bei gegebener Temperatur ermittelt wird. Zur Bildverarbeitung wurde eine manuelle Methode mit der Software ImageJ[®] genutzt. Mit Hilfe der Gleichung

$$L_p = -\frac{dV}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot R \cdot T \cdot (C_{salt}^e - C_{salt}^i)} \quad (10.2)$$

wurde die hydraulische Konduktivität bei verschiedenen Temperaturen errechnet und daraus mit Gleichung 3.29 die Aktivierungsenergie bestimmt (siehe [Tab. 10.2](#)).

Tab. 10.2: Hydraulische Konduktivität und Aktivierungsenergie von HPMEC-Zellen in Abwesenheit von Frierschutzmitteln.

| Temperatur [°C] | hydraulische Konduktivität L_p [$\mu\text{m} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] | hydraulische Konduktivität L_p [$\text{m}^3 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] | Aktivierungsenergie E_a [$\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$] |
|-----------------|--|---|---|
| 30 | 0,51 | $3,10 \cdot 10^{-10}$ | 22,7 |
| 20 | 0,43 | $2,61 \cdot 10^{-10}$ | 22,7 |
| 0 | 0,06 | $3,64 \cdot 10^{-11}$ | 22,7 |

10.4 Bestimmung der Membran-Integrität und Vitalität von Zellen

Das Vi-Cell[™] XR wurde zur automatischen Zellzählung und zur Bestimmung der Zell-Membran-Integrität mittels Trypanblau-Färbung genutzt ([Abb. 10.5](#)) und ersetzte eine aufwändige manuelle Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde während der Probenvorbereitung sowie nach der Kryokonservierung ein integrierter Autosampler

(Magazin) mit bis zu 12 Probengefäßen mit jeweils 1 mL Zellsuspension beladen. Das Ergebnis der automatischen Membran-Integritäts-Messung wurde pro Probe innerhalb von 150 s bei RT ermittelt. Innerhalb dieser Zeit wurden 50 mikroskopische Bilder automatisch erstellt und mittels Vi-Cell™-Software statistisch ausgewertet.



Abb. 10.5: Zellzähler-Messplatz zur Bestimmung der Membran-Integrität mittels Trypanblau-Färbung: Aus einem Magazin wurden automatisch bis zu 12 Proben sequenziell verarbeitet und mit einer Software ausgewertet.

Das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 von Zeiss ([Abb. 10.6](#)) wurde zur Membran-Integritäts- und Vitalitätsbestimmung von HPMEC-Zellen eingesetzt. Unter Anwendung der fluoreszierenden Farbstoffe Calcein-AM und Ethidiumhomodimer wurden vital-letal-Messungen der Zellen durchgeführt. Der biochemische Mechanismus basiert auf folgendem Prinzip: Gelangt das nicht fluoreszierende und Membran-permeierende Calcein-AM in den Intrazellularraum, so spaltet sich dort die Acetoxymethylgruppe durch Enzyme ab. Das verbleibende Calcein bindet Calciumionen und kann unter Anregung im Bereich von 490 bis 520 nm hellgrün fluoreszieren. Da nur vitale Zellen diese Enzymaktivität aufweisen, gilt eine fluoreszierende Grünfärbung unter dem Mikroskop als Nachweis für eine Zellaktivität [74]. Im Gegensatz dazu ist das Ethidiumhomodimer nicht Membran-permeierend und dringt nur

bei fehlender Membran-Integrität in die Zelle ein. Intrazellulär bindet es mit Nukleinsäuren unter Erzeugung einer fluoreszierenden Rotfärbung im Wellenlängenbereich von 495 bis 635 nm. Unter dem Mikroskop gelten rot fluoreszierende Zellen als letal [172].

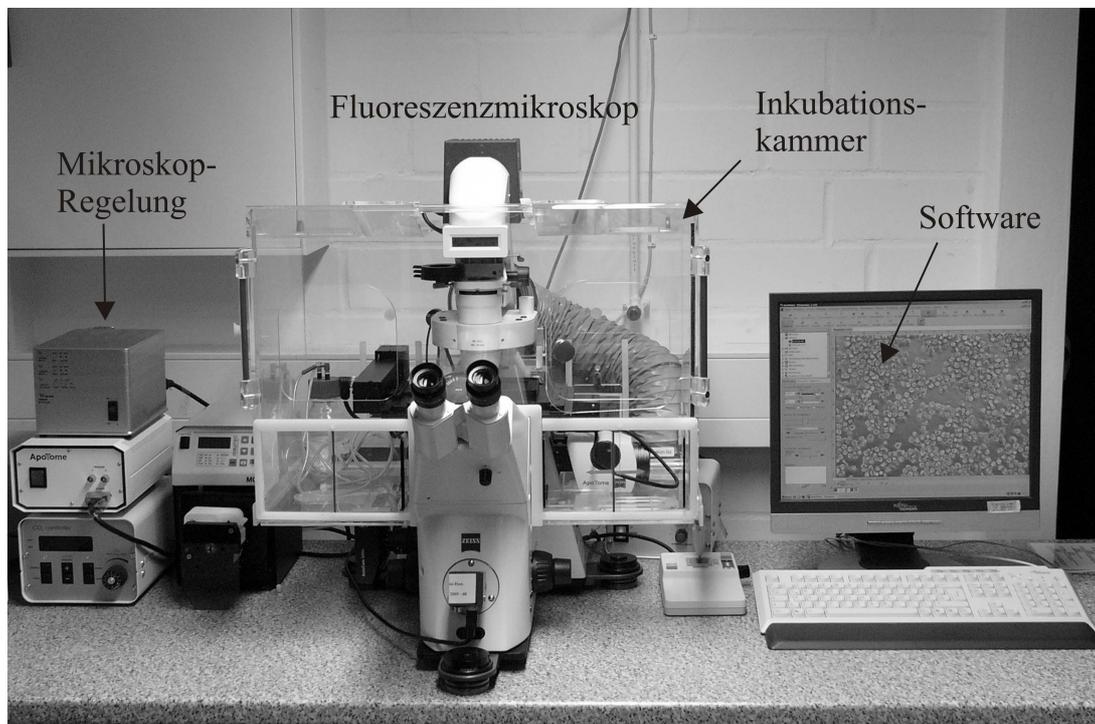


Abb. 10.6: Fluoreszenzmikroskop-Messplatz zur Bestimmung der Membran-Integrität und Zellvitalität mittels Calcein-AM- und Ethidiumhomodimer-Färbung: Das System besaß eine Mikroskop-Regelung für die Temperierung der Inkubationskammer bei 37°C und Begasung mit 5% CO₂. Die Bedienung des Mikroskops wurde über eine Zeiss-Software durchgeführt.

10.5 Neu entwickelte Programme

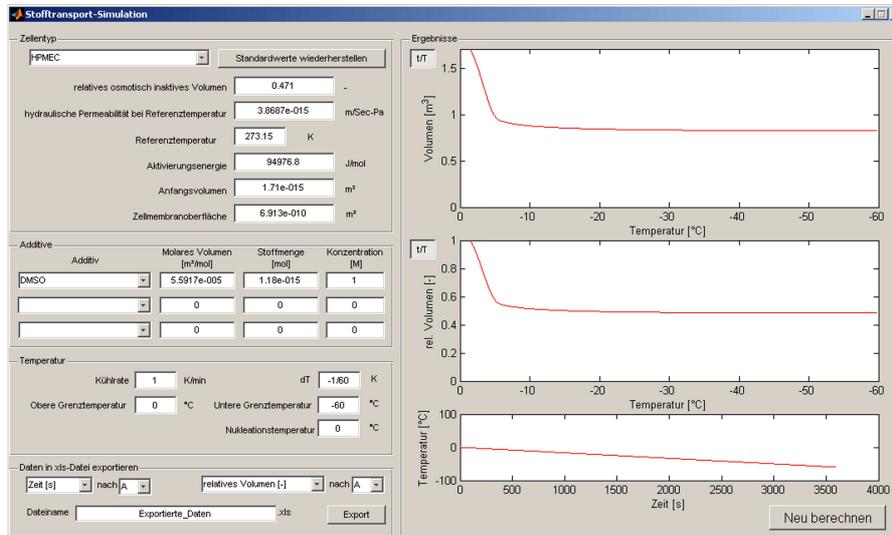


Abb. 10.7: Benutzeroberfläche des entwickelten Matlab[®]-Programms für die Stofftransport-Simulation mit Hilfe des Wassertransportmodells: Nach Einstellung des Zelltyps werden die Zelltyp-abhängigen osmotischen Parameter bereitgestellt, wie das relative osmotisch inaktive Volumen, die hydraulische Konduktivität und die Aktivierungsenergie. Des Weiteren werden die Additive und deren Konzentrationen definiert, darunter NaCl, Me₂SO oder EG. Außerdem müssen die gewünschten Temperaturen sowie die Kühlrate eingetragen werden. Die Simulation startet durch Drücken des „Neu berechnen“-Knopfes. Die simulierten Ergebnisse werden graphisch in drei Diagrammen, im $V(T)$, rel. $V(T)$ und $T(t)$ dargestellt. Alternativ können auch $V(t)$ und rel. $V(t)$ Diagramme erstellt werden. Alle Daten der Simulations-Ergebnisse können als Wertetabellen in eine Excel-Datei exportiert werden.

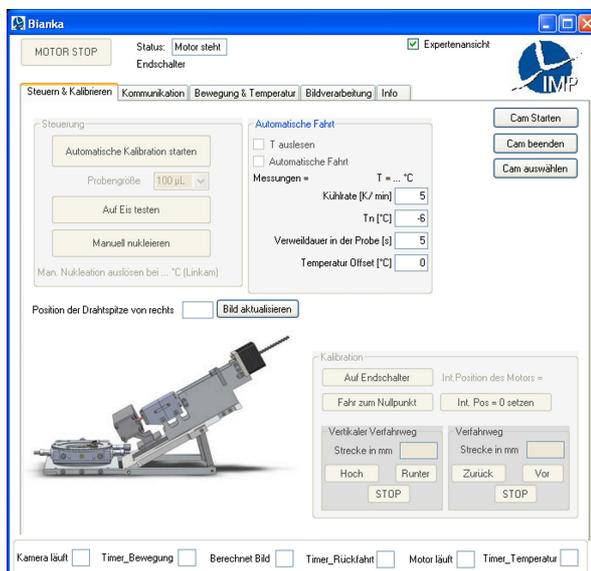
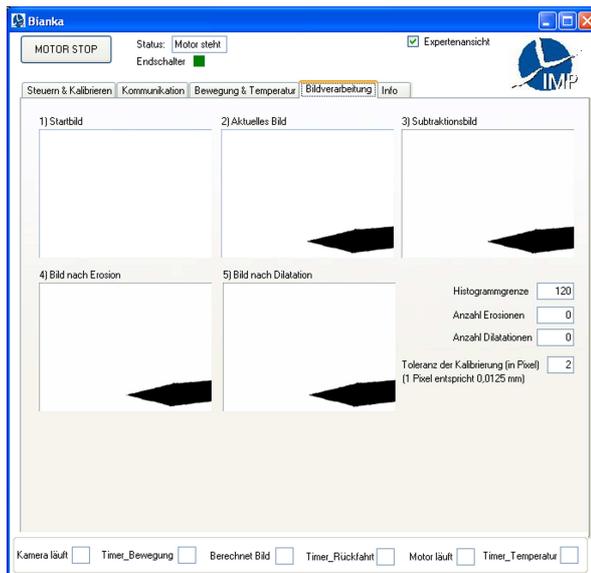
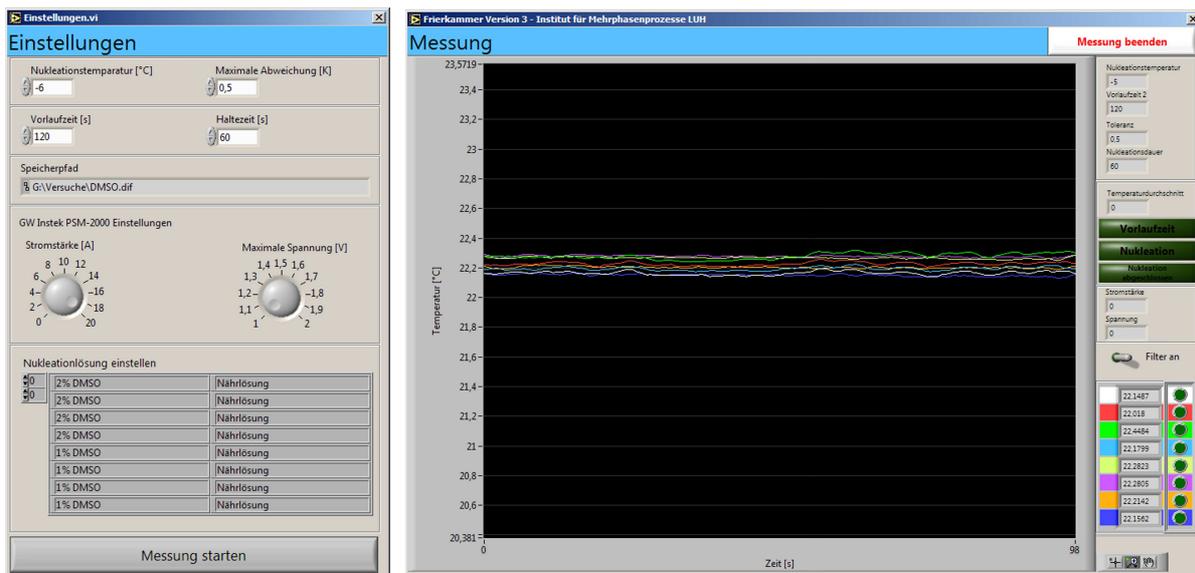


Abb. 10.8a: Benutzeroberflächen des entwickelten Visual Basic[®]-Kontroll-Programms für den Nukleator am Kryomikroskopie-Messplatz: In der Registerkarte „Steuern & Kalibrieren“ wird die vom Anwender gewünschte Nukleations-temperatur sowie die Kühlrate eingestellt.

**Abb. 10.8b:**

Benutzeroberflächen des entwickelten Visual Basic[®]-Kontroll-Programms für den Nukleator am Kryomikroskopie-Messplatz: In der Registerkarte „Bildverarbeitung“ wurde die Position der Metallstab-Spitze bestimmt, um dessen Verfahrensweg zur mikroskopischen Probe automatisch zu bestimmen.

**Abb. 10.9:**

Benutzeroberfläche des entwickelten LabVIEW[®]-Programms zur Kontrolle der Nukleationstemperatur von wässrigen Proben in 8 Kryoröhrchen innerhalb des Frierblocks: In dem Fenster „Einstellungen“ wurde die Nukleationstemperatur, eine maximale Temperatur-Abweichung, eine Vorlauf- sowie eine Haltezeit definiert. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der Nukleationslösung für jeden Kanal eingetragen. Nach dem Starten der Messung und gleichzeitiger Kühlung des Frierblocks in dem geregelten Friergerät CM2000 erfolgte die Nukleation der 8 Proben automatisch bei der gewünschten Nukleationstemperatur. Die Nukleation jedes Kanals war durch einen abrupten Temperaturanstieg in einem Temperatur-Zeit-Diagramm im Fenster „Messung“ ablesbar. Nach erfolgter Messung wurden die Messdaten in ein Microsoft Excel[®]-Format konvertiert und gespeichert.

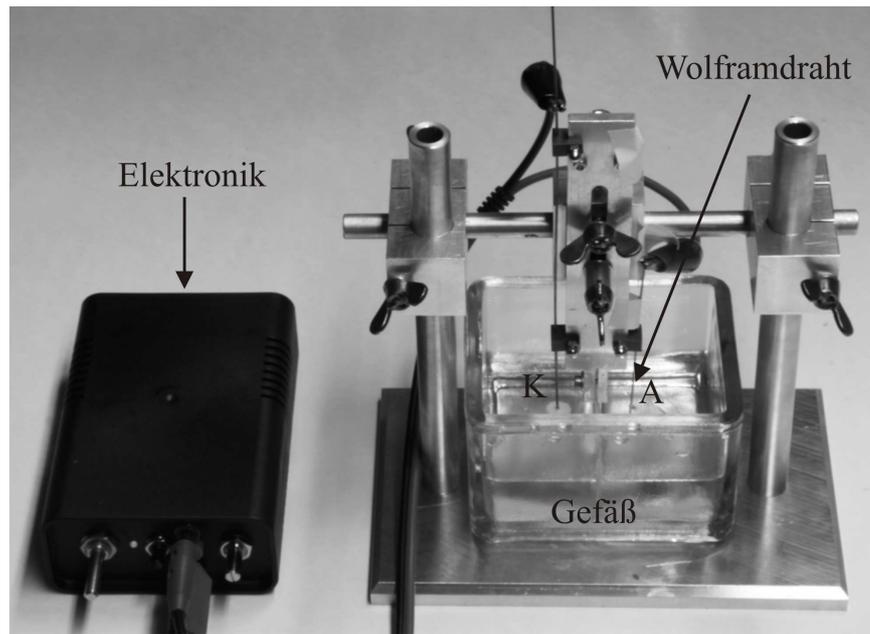


Abb. 10.10: Entwickelte Anlage zum chemischen Ätzen von Wolframdrähten zur Herstellung von Spitzen. In einem Gefäß befindet sich in einer Natriumhydroxid-Lösung eine Kathode (K) und eine Anode (A) aus Wolfram. Eine Konstantstromquelle mit einer automatischen Abschaltung (Elektronik) ermöglicht den Oxidationsprozess an der Anode, an der sich Wolfram so abträgt, dass eine konusförmige Spitze entsteht.

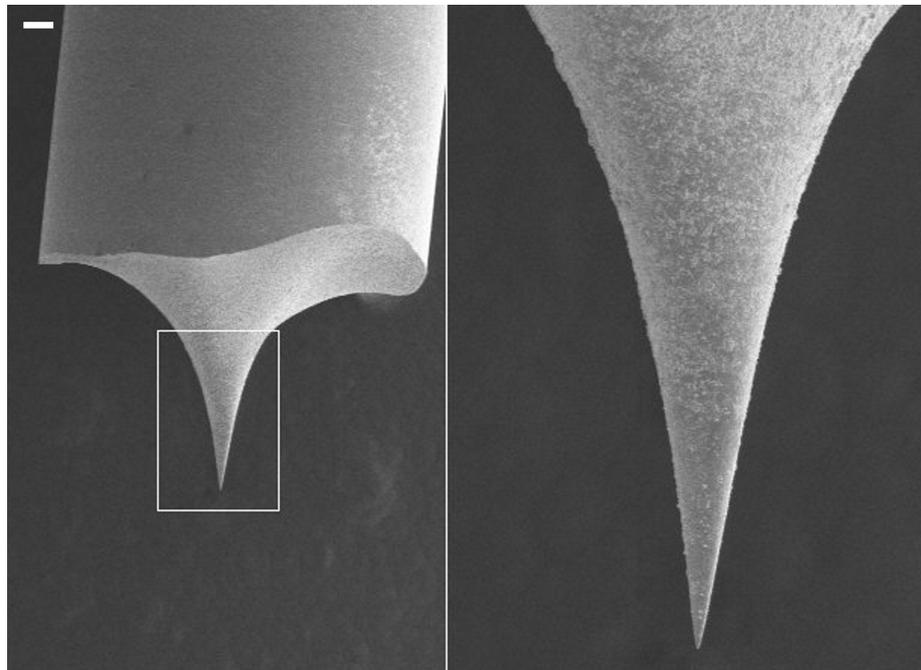


Abb. 10.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer geätzten Wolframdraht-Spitze, die mit Hilfe der Anlage aus [Abb. 10.10](#) nach zehnminütigem Ätzen erstellt wurde. Der Maßstab im linken Bild beträgt $80\ \mu\text{m}$, im rechten Bild ist ein vergrößerter Ausschnitt der Spitze dargestellt.

10.6 Liste der betreuten studentischen Arbeiten (2008-2012)

- 1) Projektarbeit von Shu Yu:
„Dokumentierung des Gefriervorgangs der 293T-Zellsuspension unter dem Kryomikroskop“ (Abschluss: Juni 2008)
- 2) Projektarbeit von Holger Zernetsch:
„Studie zum Einfluss der Vitrifikationslösung VM3 auf das Nukleationsverhalten bei der Kryokonservierung von Endothelzellen und Nierengewebe“ (Abschluss: Juli 2008)
- 3) Projektarbeit von Shu Yu:
„Differential-kalorimetrische Messungen zur Erstellung von Phasendiagrammen und TTT-Kurven der Vitrifikationslösung VM3“ (Abschluss: Dezember 2008)
- 4) Laborarbeit von Lena Heidelberg:
„Untersuchung des osmotischen Verhaltens von biologischen Zellen“ (Abschluss: Januar 2009)
- 5) Masterarbeit von Sabrina Jauch:
„Studie zum Einfluss von DMSO und VM3 auf die Vitalität von Zellen in Suspension und Gewebe während der Kryokonservierung“ (Abschluss: Mai 2009)
- 6) Laborarbeit von Janna Aumann:
„Erarbeitung von Gefrierschnitt- und Anfärbemethoden für natives Gewebe und Tissue Engineered Produkte (TEPs) in der Kryobiologie“ (Abschluss: Mai 2009)
- 7) Projektarbeit von Navid Manuchehrabadi:
„Experimental and Theoretical Characterization of Specific Absorption Rate (SAR) of iron oxide nanoparticles for biomedical heating applications“ (Abschluss: Juli 2009)
- 8) Masterarbeit von Cristiane Andrade Bier:
„Intrazelluläre Eiskristallbildung und Dehydrierung humaner Einzelzellen während der Kryokonservierung“ (Abschluss: September 2009)

- 9) Bachelorarbeit von Jing Wang:
„Konstruktion eines Kryostaten zur Temperierung von biologischen Proben im Computertomograph“ (Abschluss: Oktober 2009)
- 10) Masterarbeit von Lihua Wang:
„Entwicklung und Verifikation eines Systems zur aktiven Kontrolle der Nukleationstemperatur bei der Kryokonservierung humaner Zellen“ (Abschluss: November 2009)
- 11) Projektarbeit von Johannes Voß:
„Konstruktion, Realisierung und Ansteuerung einer Apparatur zur automatischen Eiskristallnukleation unterkühlter wässriger Proben“ (Abschluss: Januar 2011)
- 12) Projektarbeit von Lena Heidelberg:
„Equilibrium cell volume in the presence of permeating cryoprotectants“ (Abschluss: Dezember 2010)
- 13) Diplomarbeit von Helge Schöps:
„Entwicklung eines Kühlsystems und einer automatisierten bildgesteuerten Positionskalibrierung einer Metallspitze zum kontrollierten Gefrieren einer unterkühlten Probe“ (Abschluss: Juni 2011)
- 14) Projektarbeit von Lena Heidelberg:
„Studie zum Einfluss der Prozessparameter Frierschutzmittelkonzentration und Nukleationstemperatur für die Kryokonservierung“ (Abschluss: Oktober 2011)
- 15) Masterarbeit von Steven Jordane Ndzenge:
„Einfluss der Kühlrate und Frierschutzmittelkonzentration auf die intrazelluläre Eiskristallbildung beim Gefrieren von humanen Endothelzellen“ (Abschluss: November 2011)
- 16) Projektarbeit von Roman Bieneck:
„Einfluss von isothermen Haltezeiten auf Kälteschäden von humanen Endothelzellen“ (andauernd)

- 17) Projektarbeit von Caroline Rieper:
„Erstellung von quaternären Phasendiagrammen des Systems Dimethylsulfoxid-Ethylenglycol-Natriumchlorid-Wasser mittels der Differenzial-Scanning Kalorimetrie (DSC)“ (andauernd)
- 18) Projektarbeit von Jörn Hesse:
„Entwicklung und Verifikation eines Systems zum kontrollierten Auftauen kryokonservierter Proben mittels Laserstrahlung“ (andauernd)
- 19) Projektarbeit von Lena Steding:
„Studie zum Einfluss der Me₂SO-Toxizität auf humane Endothelzellen“ (andauernd)
- 20) Projektarbeit von Jan-Philipp Schmidtman:
„Konstruktion und Realisierung einer LabVIEW[®]-geregelten Apparatur zur definierten Frierschutzmittel-Dosierung während der Kryokonservierung“ (andauernd)

10.7 Liste der Paper, Abstracts, Vorträge, Poster, Erfindungen, Preise (2007-2012)

Veröffentlichte Paper:

- R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation*, *Cryobiology* 64 (2012) 3, 250-260
- U. Diekmann, R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher, T. Müller: *Cryopreservation and quality control of mouse embryonic feeder cells*, *Cryobiology* 63 (2011) 2, 104-110
- A. Ehlers, F. Baumann, R. Spindler, B. Glasmacher, B. Rosenhahn: *PCA Enhanced Training Data for Adaboost*, *Lecture Notes in Computer Science* 6854 (2011), 410-419
- D. Freimark, C. Sehl, C. Weber, K. Hudel, P. Czermak, N. Hofmann, R. Spindler, B. Glasmacher: *Systematic parameter optimization of a Me₂SO- and serum-free*

cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells, Cryobiology 63 (2011) 2, 67-75

- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation*, CryoLetters 32 (2011) 2, 148-157
- I. Bernemann, N. Manuchehrabadi, R. Spindler, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J.C. Bischof, B. Glasmacher: *Diffusion of dimethyl sulfoxide in tissue engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, Cryoletters 31 (2010) 6, 493-503
- R. Spindler, B. Glasmacher: *Kryomikroskopie: Eine Methode zur Visualisierung von Gefrierprozessen*, KI Kälte-Luft-Klimatechnik 4 (2009), 28-31
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Effect of Me2SO on membrane phase behavior and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by in situ FTIR spectroscopy*, ASME, Journal of Biomechanical Engineering 131 (2009) 7, 074517-19
- I. Bernemann, N. Hofmann, R. Spindler, A. Szentivanyi, B. Glasmacher: *Strategy to improve cryopreservation protocols*, CryoLetters 29 (2008) 1, 73-88

Veröffentlichte Abstracts:

- H. Schöps, R. Spindler, B. Glasmacher: *Entwicklung eines Kühlsystems und einer automatisierten bildgesteuerten Positionskalibrierung einer Metallspitze zum kontrollierten Gefrieren einer unterkühlten Probe*, Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V., Kurzfassungen (2011) S.13:86
- R. Spindler, B. Rosenhahn, B. Glasmacher: *Controlled nucleation and reduced CPA-concentration during freezing*, Cryobiology 63 (2011) 2, 318
- B. Glasmacher, R. Spindler, F. Evertz, H. Sun, D. Pogozykh, N. Hofmann: *Eisige Auszeit für Zellen: Neue Techniken bei der Kryokonservierung von Stammzellen*, Deutscher Kälte- und Klimatechnischer Verein e.V., Kurzfassungen (2011) I.02:5
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J. Choi, W. Wolkers, J. Bischof, B. Glasmacher: *Long-term storage of engineered tissue: Visualisation of CPA diffusion in collagen scaffolds*, Histology and Histopathology 26 (2011) 1, 33

- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J.C. Bischof, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide diffusion in tissue-engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, CryoLetters 31 (2010) 2, 193-194
- R. Spindler, B. Glasmacher: *Cryopreservation of human pulmonary endothelial cells: Determination of osmotic parameters*, CryoLetters 31 (2010) 2, 189-190
- W.F. Wolkers, U. Diekmann, T. Müller, R. Spindler, B. Glasmacher: *Cryomicroscopy and FTIR studies on gamma treated mouse embryonic fibroblast feeder cells during freezing*, CryoLetters 31 (2010) 2, 192-193
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Interaction of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol with cells during freezing*, CryoLetters 31 (2010) 2, 178
- U. Diekmann, W.F. Wolkers, R. Spindler, B. Glasmacher, T. Müller: *Effects of cryopreservation on γ -irradiated mouse embryonic feeder cells*, CryoLetters 31 (2010) 2, 174-175
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Effect of Me₂SO on membrane phase behavior and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by in situ FTIR spectroscopy*, CryoLetters 30 (2009) 2, 164
- R. Spindler, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Controlled ice nucleation during cryopreservation*, Cryobiology 57 (2008) 3, 337

Vorträge auf Konferenzen:

- B. Glasmacher, R. Spindler, F. Evertz, H. Sun, D. Pogozykh, N. Hofmann: *Eisige Auszeit für Zellen: Neue Techniken bei der Kryokonservierung von Stammzellen*, Deutsche Kälte-Klimatagung (2011), 17.-18.11.2011, Aachen
- H. Schöps, R. Spindler, B. Glasmacher: *Entwicklung eines Kühlsystems und einer automatisierten bildgesteuerten Positionskalibrierung einer Metallspitze zum kontrollierten Gefrieren einer unterkühlten Probe*, Studentenvortrag, Deutsche Kälte-Klimatagung (2011), 17.-18.11.2011, Aachen
- R. Spindler, B. Rosenhahn, B. Glasmacher: *Controlled nucleation and reduced CPA-concentration during freezing*, 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 24.-27.07.2011, Corvallis, OR, USA
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J. Bischof, B. Glasmacher: *Long-term storage of engineered tissues: Visualization of*

CPA diffusion in collagen scaffolds, TERMIS EU (2011), 07.-10.06.2011, Granada, Spanien

- B. Glasmacher, R. Spindler: *Peltier-Element basiertes System zur kontrollierten Nukleation unterkühlter biologischer Proben*, Jahrestreffen des Fachausschusses Kristallisation, ProcessNet (2010), 12.03.2010, Margdeburg
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Interaction of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol with cells during freezing*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 07.-09.09.2009, Hannover
- U. Diekmann, W.F. Wolkers, R. Spindler, B. Glasmacher, T. Müller: *Effects of cryopreservation on γ -irradiated mouse embryonic feeder cells*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 07.-09.09.2009, Hannover
- R. Spindler, B. Glasmacher: *Kryomikroskopie: Eine Untersuchungsmethode zur Visualisierung von Gefrierprozessen*, Deutsche Kälte-Klimatagung (2008), 19.-21.11.2008, Ulm
- R. Spindler, H. Sun, M. Schwarze, F. Evertz: *Untersuchung und Optimierung der Temperaturverteilung, Nukleationstemperatur, Probengeometrie und Konzentration von Frierschutzadditiven bei der Kryokonservierung biologischer Proben*, Deutsche Kälte-Klimatagung (2007), 21.-23.11.2007 Hannover

Posterpräsentationen auf Konferenzen:

- R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Hochgeschwindigkeits-Bilderfassung und automatische Bildanalyse bei der Kryokonservierung humaner Zellen*, Thermodynamik Kolloquium, Dechema, P52, 4.-6.10.2011, Frankfurt
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J. Choi, W.F. Wolkers, J. Bischof, B. Glasmacher: *Visualization of DMSO diffusion in engineering constructs for long-term storage*, wrm (2011) ,02.-04.11.2011, Leipzig
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J. Bischof, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide diffusion in microstructured tissue-engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, International Congress Nanotechnology in medicine & Biology 02.-03.11.2010, Krems, Österreich

- U. Diekmann, W.F. Wolkers, R. Spindler, B. Glasmacher, R. Blasczyk, T. Müller, *Design of a “bench top” quality control panel for mouse embryonic feeder cells*, Combined Meeting, 20.-25.11.2009, Hannover
- W.F. Wolkers, U. Diekmann, T. Müller, R. Spindler, B. Glasmacher, *Cryomicroscopy and FTIR studies on mouse embryonic fibroblast feeder cells during cryopreservation*, Combined Meeting, 20.-25.11.2009, Hannover
- R. Spindler, B. Glasmacher: *Cryopreservation of human pulmonary endothelial cells: Determination of osmotic parameters*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 07.-09.09.2009, Hannover
- W.F. Wolkers, U. Diekmann, T. Müller, R. Spindler, B. Glasmacher: *Cryomicroscopy and FTIR studies on gamma treated mouse embryonic fibroblast feeder cells during freezing*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 07.-09.09.2009, Hannover
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J.C. Bischof, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide diffusion in tissue-engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 07.-09.09.2009, Hannover
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Effect of Me₂SO on membrane phase behaviour and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by in situ FTIR spectroscopy*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 11.-12.09.2008, Kopenhagen, Dänemark
- R. Spindler, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Controlled ice nucleation during cryopreservation*, 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 20.-23.06.2008, Charlotte, USA
- R. Spindler, I. Bernemann, N. Hofmann, A. Szentivanyi, B. Glasmacher: *Strategy to improve cryopreservation protocols*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 12.-14.09.2007, Derby, England
- R. Spindler, H. Sun, M. Schwarze, F. Evertz: *Study of temperature distribution, nucleation temperature, sample geometry and concentration of cryoprotective agents in cryopreservation of biological samples*, Annual Scientific Meeting of Society for Low Temperature Biology, 12.-14.09.2007, Derby, England

Eingereichte Erfindungen:

- Vorrichtung zur Verdrängung des Kern-Proben-Volumens in Kryobehältern (08.06.2010)
- Peltier-Element basiertes System zur induzierten Nukleation (07.12.2008)

Preise:

- R. Spindler, B. Rosenhahn, B. Glasmacher: *Controlled nucleation and reduced CPA-concentration during freezing*, Student Travel Grant, 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 24.-27.07.2011, Corvallis, OR, USA
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Interaction of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol with cells during freezing*, Best Presentation Award, SLTB 2009, 07.-09.09.2009, Hannover
- I. Bernemann, R. Spindler, N. Manuchehrabadi, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J.C. Bischof, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide diffusion in tissue-engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, Best Poster Award, SLTB 2009, 07.-09.09.2009, Hannover
- R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Effect of Me₂SO on membrane phase behaviour and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by in situ FTIR spectroscopy*, Audrey Smith Travel Award SLTB 2008, 11.-12.09.2008, Kopenhagen, Dänemark
- R. Spindler, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Controlled ice nucleation during cryopreservation*, Student Travel Grant Cryo 2008, 20.-23.06.2008, Charlotte, USA

11 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. Acharya, R.V. Devireddy: *Cryomicroscopic investigation of freezing processes in cell suspensions*, The Open Biotechnology Journal 4 (2010), 26-35
- [2] J.P. Acker, A. Larese, H. Yang, A. Petrenko, L.E. McGann: *Intracellular Ice Formation Is Affected by Cell Interactions*, Cryobiology 38 (1999) 4, 363-371
- [3] J.P. Acker, L.E. McGann: *Cell-Cell Contact Affects Membrane Integrity after Intracellular Freezing*, Cryobiology 40 (2000) 1, 54-63
- [4] J.P. Acker, J.A. Elliott, L.E. McGann: *Intercellular Ice Propagation: Experimental Evidence for Ice Growth through Membrane Pores*, Biophysical Journal 81 (2001) 3, 1389-1397
- [5] J.P. Acker: *Innocuous intracellular ice improves survival of frozen cells*, Cell Transplant 11 (2002) 6, 563-571
- [6] J.P. Acker: *Protective effect of intracellular ice during freezing?*, Cryobiology 46 (2003) 2, 197-202
- [7] J.P. Acker: *persönliches Gespräch*, Institut für Mehrphasenprozesse, Hannover, 15.01.2009
- [8] M. Akhoondi, H. Oldenhof, C. Stoll, H. Sieme, W.F. Wolkers: *Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells*, Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes 1808 (2011) 3, 642-648
- [9] M. Akhoondi: *persönliches Gespräch*, 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Corvallis, Oregon, USA, 24.07.2011

- [10] R. Alapati, M. Stout, J. Saenz, G.T. Gentry Jr, R.A. Godke, R.V. Devireddy: *Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa*, *Cryobiology* 59 (2009) 2, 164-170
- [11] G.M. Alink, C.C. Verheul, F.G.J. Offerijns: *Isolation and low temperature preservation of adult rat heart cells*, *Cryobiology* 14 (1977) 4, 399-408
- [12] E. Anastassopoulos: *Agar plate freezing assay for the in situ selection of transformed ice nucleating bacteria*, *Cryobiology* 53 (2006) 2, 276-278
- [13] C.A. Angell, Y. Choi: *Crystallization and vitrification in aqueous systems*, *Journal of Microscopy* 141 (1985), 251-261
- [14] T. Arakawa, J.F. Carpenter, Y.A. Kita, J.H. Crowe: *The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis*, *Cryobiology* 27 (1990) 4, 401-415
- [15] H.D. Baehr, S. Kabelac: *Thermodynamik*, 14. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2009)
- [16] S.K. Balasubramanian, J.C. Bischof, A. Hubel: *Water transport and IIF parameters for a connective tissue equivalent*, *Cryobiology* 52 (2006) 1, 62-73
- [17] D.H. Ballard, C.M. Brown: *Computer Vision*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey (1982)
- [18] J. Bandekar: *Amide modes and protein conformation*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1120 (1992) 2, 123-143
- [19] J.M. Baust, R. Van Buskirk, J.G. Baust: *Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 36 (2000) 4, 262-270
- [20] J.G. Baust, J.M. Baust: *Advances in biopreservation*, CRC/Taylor & Francis group, Boca Raton, London, New York (2006)

- [21] F. Beaujean, J.H. Bourhis, C. Bayle, H. Jouault, M. Divine, C. Rieux, M. Janvier, Ch. Le Forestier, J.L. Pico: *Successful cryopreservation of purified autologous CD34+ cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment*, Bone Marrow Transplantation 22 (1998) 11, 1091-1096
- [22] I. Bernemann, N. Hofmann N, A. Szentivanyi, M. Kuberka, B. Glasmacher: *Strategie zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen*, DKV-Jahresbericht 33 (2006) Band I, 49-60
- [23] I. Bernemann, N. Hofmann, R. Spindler, A. Szentivanyi, B. Glasmacher: *Strategy to improve cryopreservation protocols*, CryoLetters 29 (2008) 1, 73-88
- [24] I. Bernemann, N. Hofmann, A. Szentivanyi, M. Kuberka, B. Glasmacher: *Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen: Systematische Parameteranalyse*, KI Kälte-Luft-Klimatechnik, KI-01-02 (2008), 24-27
- [25] I. Bernemann, N. Manuchehrabadi, R. Spindler, J.H. Choi, W.F. Wolkers, J.C. Bischof, B. Glasmacher: *Diffusion of dimethyl sulfoxide in tissue engineered collagen scaffolds visualized by computer tomography*, CryoLetters 31 (2010) 6, 493-503
- [26] E.K. Bigg: *The formation of atmospheric ice crystals by the freezing of droplets*, Quart. L. Met. Soc. 79 (1953) 342, 510-519
- [27] J.C. Bischof, W.M. Fahssi, D. Smith, T. Nagel, D.J. Swanlund: *A parametric study of freezing injury in ELT-3 uterine leiomyoma tumour cells*, Human Reproduction 16 (2001) 2, 340-348
- [28] J.C. Bischof, W.F. Wolkers, N.M. Tsvetkova, A.E. Oliver, J.H. Crowe: *Lipid and Protein Changes Due to Freezing in Dunning AT-1 cells*, Cryobiology 45 (2002) 1, 22-32

- [29] A. Blicher, K. Wodzinska, M. Fidorra, M. Winterhalter, T. Heimburg: *The Temperature Dependence of Lipid Membrane Permeability, its Quantized Nature, and the Influence of Anesthetics*, Biophysical Journal 96 (2009) 11, 4581-4591
- [30] I. Braslavsky, S.G. Lipson: *Electrofreezing effect and nucleation of ice crystals in free growth experiments*, Appl. Phys. Lett. 72 (1998) 2, 264-266
- [31] V.L. Bronshteyn, P.L. Steponkus: *Calorimetric studies of freeze-induced dehydration of phospholipids*, Biophysical Journal 65 (1993) 5, 1853–1865
- [32] I.N. Bronstein, K.A. Semendjajew: *Taschenbuch der Mathematik*, 25. Auflage, Verlag Harri Deutsch Thun, Frankfurt (1991)
- [33] M.J. Burke, S.E. Lindow: *Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: theoretical considerations*, Cryobiology 27 (1990) 1, 80-84
- [34] J. Caldwell, Y.Y. Kwan: *Numerical methods for one-dimensional Stefan problems*, Communications in Numerical Methods in Engineering 20 (2004), 535-545
- [35] C.D. Char, S.N. Guerrero, S.M. Alzamora: *Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for Listeria innocua in orange juice*, Food Bioprocess Technology 3 (2010) 5, 752-761
- [36] R. Chow, R. Blindt, R. Chivers, M. Povey: *The sonocrystallisation of ice in sucrose solutions: primary and secondary nucleation*, Ultrasonics 41 (2003) 8, 595-604
- [37] P. Clark, G.M. Fahy, A.M. Jr. Karow: *Factors Influencing Renal Cryopreservation. II. Toxic Effects of Three Cryoprotectants in Combination with Three Vehicle Solutions in Nonfrozen Rabbit Cortical Slices*, Cryobiology 21 (1984) 3, 274-284

- [38] R.C. de Freitas, K.R. Diller: *Intracellular Ice Formation in Three-Dimensional Tissues: Pancreatic Islets*, Cell Preservation Technology 2 (2004) 1, 19-28
- [39] I.A.M. de Graaf, A.L. Draaisma, O. Schoeman, G.M. Fahy, G.M.M. Groothuis, H.J. Koster: *Cryopreservation of rat-precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification*, Cryobiology 54 (2007) 1, 1-12
- [40] J.A. Elliott: *persönliches Gespräch*, 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charlotte, North Carolina, USA, 23.06.2008
- [41] A. E. Delgado, L. Zheng, D.-W. Sun: *Influence of Ultrasound on Freezing Rate of Immersion-frozen Apples*, Food and Bioprocess Technology 2 (2007) 3, 263-270
- [42] R.V. Devireddy, D.J. Swanlund, T. Olin, W. Vincente, M.H.T. Troedsson, J.C. Bischof, K.P. Roberts: *Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry*, Biology of Reproduction 66 (2002) 1, 22-231
- [43] R.V. Devireddy, S. Thirumala, J.M. Gimble: *Cellular response of adipose derived passage-4 adult stem cells to freezing stress*, Journal of Biomechanical Engineering, Journal of Biomechanical Engineering 127 (2005) 7, 1081-1086
- [44] U. Diekmann, R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher, T. Müller: *Cryopreservation and quality control of mouse embryonic feeder cells*, Cryobiology 63 (2011) 2, 104-110
- [45] K.R. Diller: *Intracellular freezing in glycerolized red cells*, Cryobiology 16 (1979) 2, 125-131
- [46] K.R. Diller: *Bioheat and Mass Transfer as Viewed Through a Microscope*, Journal of Biomechanical Engineering 127 (2005) 1, 67-84

- [47] J.B. Doolittle, G. Vali: *Heterogeneous Freezing Nucleation in Electric Fields*, Journal of the Atmospheric Sciences 32 (1975) 2, 375-379
- [48] R.C. Dougherty, L.N. Howard: *Equilibrium structural model of liquid water: Evidence from heat capacity, spectra, density, and other properties*, Journal of Chemical Physics 109 (1998) 17, 7379-7393
- [49] E.Z. Drobnis, L.M. Crowe, T. Berger, T.J. Anchordoguy, J.W. Overstreet, J.H. Crowe: *Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase Transition in Cell Membranes: A Demonstration Using Sperm as a Model*, The Journal of Experimental Zoology 265 (1993) 4, 432-437
- [50] F. Dumont, P.A. Marechal, P. Gervais: *Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates*, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 1, 268-272
- [51] P. Echlin: *Low-Temperature Microscopy and Analysis*, Plenum Press, New York (1992)
- [52] A. Ehlers, F. Baumann, R. Spindler, B. Glasmacher, B. Rosenhahn: *PCA Enhanced Training Data for Adaboost*, Lecture Notes in Computer Science 6854 (2011), 410-419
- [53] P. Ellis, E. Müller-Schweinitzer : *Maintenance of functional activity of human pulmonary arteries after cryopreservation*, Br. J. Pharmacol. 103 (1991), 1377-1380
- [54] H.Y. Elmoazzen, A. Poovadan, G.K. Law, J.A.W. Elliott, L.E. McGann, N.M. Jomha: *Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage*, Cell Tissue Banking 8 (2007) 2, 125-133

- [55] F. Evertz, A. Szentivanyi, I. Bernemann, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Development of a new controlled rate μ -freezing device for systematic parameter optimization in cryopreservation*, *Cryobiology* 57 (2008) 3, 337
- [56] G.M. Fahy: *The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology*, *Cryobiology* 23 (1986) 1, 1-13
- [57] G.M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, S. Paynter: *Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity*, *Cryobiology* 48 (2004) 1, 22-35
- [58] G.M. Fahy, B. Wowk, J. Wu: *Cryopreservation of complex systems: the missing link in the regenerative medicine supply chain*, *Rejuvenation Res.* 9 (2006) 2, 279-291
- [59] G.M. Fahy: *persönliches Gespräch*, 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charlotte, North Carolina, USA, 22.06.2008
- [60] G.M. Fahy: *Cryoprotectant toxicity neutralization*, *Cryobiology* 60 (2010) 3, S45-S53
- [61] N.H. Fletcher: *The Chemical Physics of Ice*, Cambridge University Press, New York (1970)
- [62] F. Franks: *The nucleation of ice in undercooled aqueous solutions*, *CryoLetters* 2 (1981), 27-31
- [63] F. Franks: *The properties of aqueous solutions at subzero temperatures*. In: *Water: A Comprehensive Treatise* 7, Plenum Press, New York (1982)
- [64] D. Freimark, C. Sehl, C. Weber, K. Hudel, P. Czermak, N. Hofmann, R. Spindler, B. Glasmacher: *Systematic parameter optimization of a Me_2SO - and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells*, *Cryobiology* 63 (2011) 2, 67-75

- [65] C. Friend, H.A. Freedman: *Effects and possible mechanism of action of dimethylsulfoxide on friend cell differentiation*, *Biochemical Pharmacology* 27 (1978) 9, 1309-1313
- [66] B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson: *Life in the Frozen State*, CRC Press LLC, Boca Raton (2004)
- [67] J.A. Gilmore, J. Liu, D.Y. Gao, J.K. Critser: *Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa*, *Human Reproduction* 12 (1997) 1, 112-118
- [68] A.A. Gurtovenko, J. Anwar: *Modulating the structure and properties of cell membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide*, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 35, 10453-10460
- [69] M. Hagedorn, A. Peterson, P. Mazur, F.W. Kleinhans: *High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option*, *Cryobiology* 49 (2004) 2, 181-189
- [70] B. Han, J.C. Bischof: *Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing*, *Cryobiology* 48 (2004) 1, 8-21
- [71] B. Han, J.H. Coi, J.A. Dantzig, J.C. Bischof: *A quantitative analysis on latent heat of an aqueous binary mixture*, *Cryobiology* 52 (2006) 1, 146-151
- [72] X. Han, H.B. Ma, C. Wilson, J.K. Critser: *Effects of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions*, *Microfluid Nanofluid* 4 (2007) 4, 357-361
- [73] X. Han, Y. Liu, J.K. Critser: *Determination of the quaternary phase diagram of the water-ethylene glycol-sucrose-NaCl system and a comparison between two theoretical methods for synthetic phase diagrams*, *Cryobiology* 61 (2010) 1, 51-57

- [74] R. Hänsel, O. Sticher: *Pharmakognosie Phytopharmazie*, 9. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg (2010)
- [75] X. He: *Thermostability of Biological Systems: Fundamentals, Challenges and Quantification*, The Open Biomedical Engineering Journal 5 (2011), 47-73
- [76] I. Heschel, G. Rau: *Numerische Berechnungen zum Erstarrungsverlauf in wässrigen Salzlösungsproben mit Bezug zur Kryobiologie*, Chemie Ingenieur Technik 65 (1993) 1, 63-66
- [77] I. Heschel: *Verfahrensgestaltung bei der Tiefkühlkonservierung biologischer Systeme unter den Aspekten Homogenität und Dynamik*, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen (2002)
- [78] P.V. Hobbs: *Ice Physics*, Clarendon Press, Oxford (1974)
- [79] M.R. Holman, S.J. Rowland: *Design and development of a new cryosurgical instrument utilizing the Peltier thermoelectric effect*, Journal of Medical Engineering and Technology 21 (1997) 3-4, 106-110
- [80] N. Hofmann, I. Bernemann, D. Pogozykh, B. Glasmacher: *Development of systematic parameter optimisation for cryopreservation regimens for cellular suspensions*. Problems of Cryobiology 21 (2011), 2 (ISSN: 0233-7673)
- [81] R. Hredzák, A. Ostró, I. Maraček, J. Kačmarik, V. Ždilová, J. Veselá: *Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos*, Acta Veterinaria Brno 74 (2005), 23-27
- [82] Y. Huang, B. Rubinsky: *Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization*, Sensors and Actuators A 89 (2001) 3, 242-249

- [83] A. Hubel, T.B. Darr, A. Chang, J. Dantzig: *Cell partitioning during the directional solidification of trehalose solutions*, *Cryobiology* 55 (2007) 3, 182-188
- [84] A. Hubel: *persönliches Gespräch*, 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charlotte, North Carolina, USA, 21.06.2008
- [85] T. Inada, X. Zhang, Y. Yabe, Y. Kozawa: *Active control of phase change from supercooled water to ice by ultrasonic vibration 1. Control of freezing temperature*, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 44 (2001) 23, 4523-4531
- [86] V. Isachenko, E. Isachenko, I.I. Katkov, M. Montag, S. Dessole, F. Nawroth, H. Van Der Ven: *Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability*, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 4, 1167-73
- [87] H. Ishiguro, B. Rubinsky: *Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification*, *Cryobiology* 31 (1994) 5, 483-500
- [88] M. Jochem, Ch. Körber: *A numerical solution of the coupled heat and mass transfer problem of non-planar solidification and melting of aqueous solutions*, *Wärme- und Stoffübertragung* 28 (1993) 4, 195-204
- [89] A.G. Jones: *Crystallization Process Systems*, Butterworth-Heinemann, Oxford (2002)
- [90] J.O.M. Karlsson, E.G. Cravalho, I.H.M. Borel Rinke, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, M. Toner: *Nucleation and Growth of Ice Crystals Inside Cultured Hepatocytes During Freezing in the Presence of Dimethyl Sulfoxide*, *Biophysical Journal* 65, (1993) 6, 2524-2536

- [91] J.O.M. Karlsson, E.G. Cravalho, M. Toner: *A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing*, J. Appl. Phys. 75 (1994) 9, 4442-4455
- [92] G. Karran, M. Legge: *Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixture*, Human Reproduction 11 (1996) 12, 2681-2686
- [93] D. Kashchiev: *Nucleation*, Butterworth-Heinemann, Oxford (2000)
- [94] D.J. Kashchiev: *On the relation between nucleation work, nucleus size, and nucleation rate*, Chem. Phys. 76 (1982), 5098-5102
- [95] I.I. Katkov, N. Katkova, J.K. Critser, P. Mazur: *Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration*, Cryobiology 37 (1998) 4, 325-338
- [96] I.I. Katkov, V. Isachenko, E. Isachenko, M.S. Kim, A.I. Lulat, A.M. Mackay, F. Levine: *Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells*, International Journal of Refrigeration 29 (2006) 3, 346-357
- [97] N. Kharasch, B.S. Thyagarajan: *Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 411 (1983), 391-402
- [98] M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, C. Grabielle-Madmond, M. Ollivon: *DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering, and calorimetry*, Journal of Alloys and Compounds 286 (1999) 1-2, 195-202
- [99] W. Kleber, H.-J. Bautsch, J. Bohm: *Einführung in die Kristallographie*, 18. Auflage, Oldenbourg, Berlin (1998)
- [100] F.W. Kleinhans: *Membrane permeability modelling: Kedem-Katchalsky vs a two-parameter formalism*, Cryobiology 37 (1998) 4, 271-289

- [101] F.W. Kleinhans, J.F. Guenther, D.M. Roberts, P. Mazur: *Analysis of intracellular ice nucleation in Xenopus oocytes by differential scanning calorimetry*, *Cryobiology* 52 (2006) 1, 128-138
- [102] F.W. Kleinhans, P. Mazur: *Determination of the water permeability (L_p) of mouse oocytes at -25°C and its activation energy at subzero temperatures*, *Cryobiology* 58 (2009) 2, 215-224
- [103] J. Kong, S. Yu: *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39 (2007) 8, 549-559
- [104] O. König, P. Rechsteiner, B. Trusch, C. Andreoli, J. Hulliger: *Equipment for controlling nucleation and tailoring the size of solution-grown singel crystals*, *Journal of Applied Crystallography* 30 (1997) 4, 507-509
- [105] J. Kopeika, E. Kopeika, T. Zhang, D.M. Rawson: *Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (*Misgurnus fossilis*) sperm and the effect on subsequent embryo development*, *CryoLetters* 24 (2003) 6, 365-374
- [106] Ch. Körber, G. Rau: *Interaction of particles and a moving ice-liquid interface*, *Journal of Crystal Growth* 72 (1985) 3, 649-662
- [107] Ch. Körber, G. Lipp, B. Nummer, M. Kochs, G. Rau: *Ice Crystal Growth in Aqueous Solutions and Suspensions* In: *Physics and Chemistry of Ice*, Hokkaido University Press, Sapporo (1992)
- [108] V. Krump-Konvalinkova, F. Bittinger, R.E. Unger, K. Peters, H.A. Lehr, C.J. Kirkpatrick: *Generation of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Lines*, *Laboratory Investigation* 81 (2001) 12, 1717-1727

- [109] Y. Krüger, P. Stoller, J. Ricka, M. Frenz: *Femtosecond lasers in fluid-inclusion analysis: overcoming metastable phase states*, European Journal of Mineralogy 19 (2007) 5, 693-706
- [110] M. Kuberka, G. Rau, B. Glasmacher: *Cryopreservation of epithelial kidney cells*, Biomedizinische Technik 48 (2003) Ergänzungsband 1, 322-323
- [111] L.L. Kuleshova, A. Lopata: *Vitrification can be more favorable than slow cooling*, Fertility and Sterility 78 (2002) 3, 449-454
- [112] W. Kurz, D.J. Fischer: *Fundamentals of Solidification*, Third Edition, Trans. Tech. Publications Ltd., Aedermannsdorf, Schweiz (1989)
- [113] A. Lawson, H. Ahmad, A. Sambanis: *Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions*, Cryobiology 62 (2011) 2, 115-122
- [114] A. Lawson, I.N. Mukherjee, A. Sambanis: *Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or native tissues*, Cryobiology 64 (2012) 1, 1-11
- [115] G. Lipp, Ch. Körber: *On the engulfment of spherical particles by a moving ice-liquid interface*, Journal of Crystal Growth 130 (1993) 3-4, 475-489
- [116] J.E. Lovelock: *The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing*, Biochimica et Biophysica Acta 11 (1953) 1, 28-36
- [117] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox: *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag, Berlin (2005)
- [118] S.P. Leibo, J. Farrant, P. Mazur, M.G. Jr. Hanna, L.H. Smith: *Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: Interactions of cooling and*

warming rates in the presence of pvp, sucrose, or glycerol, *Cryobiology* 6 (1970) 4, 315-332

- [119] R.L. Levin, E.G. Cravalho, C.G. Huggins: *A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures*, *Cryobiology* 13 (1976) 4, 415-429
- [120] B. Lindinger, R. Mettin, R. Chow, W. Lauterborn: *Ice Crystallization Induced by Optical Breakdown*, *Phys. Rev. Lett.* 99 (2007) 4, 045701.1-045701.4
- [121] K. Lippert, E.A. Galinski: *Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 (1992) 1, 61-65
- [122] X.-H. Liu, H. Pan, P. Mazur: *Permeation and toxicity of ethylene glycol and methanol in larvae of Anopheles gambiae*, *The Journal of Experimental Biology* 206 (2003), 2221-2228
- [123] G.H. Lyman, H.D. Preisler, D. Papahadjopoulos: *Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukaemic cell differentiation*, *Nature* 262 (1976), 360-363
- [124] S.S. Newton, T. Subramoniam: *Cryopreservation in penaeid prawn embryos*, *Cryobiology* 33 (1996) 1, 172-177
- [125] G.I. Malinin: *Cytotoxic effect of dimethylsulfoxide on the ultrastructure of cultured rhesus kidney cells*, *Cryobiology* 10 (1973) 1, 22-32
- [126] L. Mao, H.S. Udaykumar, J.O.M. Karlsson: *Simulation of micro-scale interaction between ice and biological cells*, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 46 (2003), 5123-5136

- [127] J.J. Monaghan, H.E. Huppert, M.G. Worster: *Solidification using smoothed particle hydrodynamics*, Journal of Computational Physics 206 (2005) 2, 684-705
- [128] L.E. McGann, M.L. Walterson: *Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone*, Cryobiology 24 (1987) 1, 11-16
- [129] J. Majewski, R. Popovitz-Biro, R. Edgar, M. Arbel-Haddad, K. Kjaer, W. Bouwman, J. Als-Nielsen, M. Lahav, L. Leiserowitz: *An Insight into the Ice Nucleation Process via Design of Crystalline Ice Nucleation of variable Size*, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 44, 8874-8877
- [130] A. Margaritis, A.S. Bassi: *Principles and Biotechnological Applications of Bacterial Ice Nucleation*, Crit. Rev. Biotech. 11 (1991) 3, 277-295
- [131] P. Mazur: *Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells*, Cryobiology 2 (1966) 4, 181-192
- [132] P. Mazur, S.P. Leibo, E.H.Y. Chu: *A two-factor hypothesis of freezing injury*, Experimental Cell Research 71 (1972) 2, 345-355
- [133] P. Mazur: *The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates*, Cryobiology 14 (1977) 3, 251-272
- [134] P. Mazur, W.F. Rall, N. Rigopoulos: *Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes*, Biophys. J. 36 (1981) 3, 653-675
- [135] P. Mazur: *Freezing of living cells: mechanisms and implications*, Am. J. Physiol. 247 (1984), C125-C142

- [136] P. Mazur, K.W. Cole: *Roles of Unfrozen Fraction, Salt Concentration, and Change in Cell Volume in the Survival of Frozen Human Erythrocytes*, *Cryobiology* 26 (1989) 1, 1-29
- [137] P. Mazur: *A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology*, *Cryobiology* 60 (2010) 1, 4-10
- [138] H.T. Meryman: *Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes*, *Nature* 218 (1968) 5139, 333-336
- [139] G. Missous, B. Thammavongs, V. Dieuleveux, M. Guéguen, J.M. Panoff: *Improvement of the cryopreservation of the fungal starter Geotrichum candidum by artificial nucleation and temperature downshift control*, *Cryobiology* 55 (2007) 1, 66-71
- [140] G.J. Morris, E. Acton, K. Faszler, A. Franklin, H.Yin, R. Bodine, J. Pareja, N. Zaniovic, R. Gosden: *Cryopreservation of murine embryos, human spermatozoa and embryonic stem cells using a liquid nitrogen-free, controlled rate freezer*, *Reproductive BioMedicine Online* 13 (2006) 3, 421-426
- [141] R.E. Mrak: *Opposite effects of dimethyl sulfoxide and ethanol on synaptic membrane fluidity*, *Alcohol* 9 (1992) 6, 513-517
- [142] S.P. Myers, R.E. Pitt, D.V. Lynch, P.L. Steponkus: *Characterization of intracellular ice formation in Drosophila melanogaster embryos*, *Cryobiology* 25 (1989) 5, 472-484
- [143] K. Nakagawa, A. Hottot, S. Vessot, J. Andrieu: *Influence of controlled nucleation by ultrasound on ice morphology of frozen formulations for pharmaceutical proteins freeze-drying*, *Chemical Engineering and Processing* 45 (2006) 9, 783-791
- [144] F. Nawroth, V. Isachenko, S. Dessole, G. Rahimi, M. Farina, N. Vargiu, P. Mallmann, M. Dattena, G. Capobianco, D. Peters, I. Orth, E. Isachenko:

Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants, *CryoLetters* 23 (2002) 2, 93-102

- [145] R. Notman, M. Noro, B. O'Malley, J. Anwar: *Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes*, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 43, 13982-13983
- [146] B. Nunner: *Gerichtete Erstarrung wässriger Lösungen und Zellsuspensionen*, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen (1992)
- [147] A. Olmo, R. Baena, R. Risco: *Use of a droplet nucleation analyzer in the study of water freezing kinetics under the influence of ultrasound waves*, *International Journal of Refrigeration* 31 (2008) 2, 262-269
- [148] J. Pasch, A. Schiefer, I. Heschel, G. Rau: *Cryopreservation of keratinocytes in a monolayer*, *Cryobiology* 39 (1999) 2, 158-168
- [149] J. Pasch, A. Schiefer, I. Heschel, N. Dimoudis, G. Rau: *Variation of the HES Concentration for the Cryopreservation of Keratinocytes in Suspensions and in Monolayers*, *Cryobiology* 41 (2000) 2, 89-96
- [150] D.E. Pegg, C.J. Hunt, L.P. Fong: *Osmotic properties of the rabbit corneal endothelium and their relevance to cryobiology*, *Cell Biochemistry and Biophysics* 10 (1987) 2, 169-189
- [151] D.E. Pegg, M.P. Diaper: *The "Unfrozen Fraction" Hypothesis of Freezing Injury to Human Erythrocytes: A Critical Examination of the Evidence*, *Cryobiology* 26 (1989) 1, 30-43
- [152] D.E. Pegg, L. Wang, D. Vaughan: *Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method*, *Cryobiology* 52 (2006) 3, 360-368

- [153] P. Perona, J. Malik: *Scale-space and edge detection using anisotropic diffusion*, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 12 (1990), 169-189
- [154] N. Pertaya, C.B. Marshall, Y. Celik, P.L. Davies, I. Braslavsky: *Direct Visualization of Spruce Budworm Antifreeze Protein Interacting with Ice Crystals: Basal Plane Affinity Confers Hyperactivity*, Biophysical Journal 95 (2008) 1, 333-341
- [155] A. Petersen, H. Schneider, G. Rau, B. Glasmacher: *A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature*, Cryobiology 53 (2006) 2, 248-257
- [156] A. Petersen, G. Rau, B. Glasmacher: *Reduction of primary freeze-drying time by electric field induced ice nucleus formation*, Heat and Mass Transfer 42 (2006) 10, 929-938
- [157] A. Petersen: *Grundlagen der elektrisch induzierten Eiskeimbildung und ihre Anwendung in der Kryobiologie*, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen (2007)
- [158] Y. Pichugin, G.M. Fahy, R. Morin: *Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification*, Cryobiology 52 (2006) 2, 228-240
- [159] R.E. Pitt, M. Chandrasekaran, J.E. Parks: *Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling*, Cryobiology 29 (1992) 3, 359-373
- [160] M. Plachinta, T. Zhang, D.M. Rawson: *Studies on cryoprotactant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes*, CryoLetters 25 (2004) 6, 415-425
- [161] A.M. Porsche, Ch. Körber, S. Englich, U. Hartmann, G. Rau: *Determination of the permeability of human lymphocytes with a microscope diffusion chamber*, Cryobiology 23 (1986) 4, 302-316

- [162] U. Rauen, T. Noll, H.M. Piper, W. Lauchart, H.D. Becker, H. de Groot: *Endothelial cell toxicity of preservation solutions: Comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state*, *Cryobiology* 31 (1994) 2, 144-153
- [163] R.C. Prickett, J.A.W. Elliott, L.E. McGann: *Application of the osmotic virial equation in cryobiology*, *Cryobiology* 60 (2010) 1, 30-42
- [164] H.R. Pruppacher: *Electrofreezing of supercooled water*, *Pure and Applied Geophysics* 104 (1973) 1, 623-634
- [165] Y. Rabin: *A general model for the propagation of uncertainty in measurement into heat transfer simulations and its application to cryosurgery*, *Cryobiology* 46 (2003) 2, 109-120
- [166] W.F. Rall, D.S. Reid, J. Farrant: *Innocuous biological freezing during warming*, *Nature* 286 (1980), 511-514
- [167] W.F. Rall, P. Mazur, J.J. McGrath: *Depression of the ice-nucleation temperature of rapid cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide*, *Biophys. J.* 41 (1983) 1, 1-12
- [168] W. Rau: *Eiskeimbildung durch dielektrische Polarisierung*, *Z. Naturforsch.* 6a (1951), 649-657
- [169] K.L. Roach, K.R. King, K. Uygun, S.C. Hand, I.S. Kohane, M.L. Yarmush, M. Toner: *High-throughput single cell arrays as a novel tool in biopreservation*, *Cryobiology* 58 (2009) 3, 315-321
- [170] L.U. Ross-Rodriguez, J.A.W. Elliott, L.E. McGann: *Investigating cryoinjury using simulations and experiments. 1: TF-1 cells during two-step freezing (rapid cooling interrupted with a hold time)*, *Cryobiology* 61 (2010) 1, 38-45

- [171] S.D. Rowley, G.L. Anderson: *Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells*, Bone Marrow Transplantation 11 (1993) 5, 389-393
- [172] R.W. Sabnis: *Handbook of biological dyes and stains - Synthesis and industrial applications*, Wiley, Hoboken, New Jersey (2010)
- [173] A. Saito, S. Okawa, A. Tojiki, H. Une, K. Tanogashira: *Fundamental research on external factors affecting the freezing of supercooled water*, Int. J. Heat Mass Transfer 35 (1992) 10, 2527-2536
- [174] M.W. Scheiwe: *Untersuchungen zum Verhalten der Langzeitkonservierung lebender Blutzellen durch Gefrieren*, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der RWTH Aachen (1981)
- [175] M.W. Scheiwe, C. Körber: *Quantitative cryomicroscopy analysis of intracellular freezing of granulocytes without cryoadditive*, Cryobiology 24 (1987) 5, 473-483
- [176] S. Seki, P. Mazur: *The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure*, Cryobiology 59 (2009) 1, 75-82
- [177] Z. Shaozhi, D.E. Pegg: *Analysis of the permeation of cryoprotectants in cartilage*, Cryobiology 54 (2007) 2, 146-153
- [178] T. Shichiri, Y. Araki: *Nucleation mechanism of ice crystals under electrical effect*, Journal of Crystal Growth 78 (1986) 3, 502-508
- [179] K. Shimada, E. Asahina: *Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at -27°C* , Cryobiology 12 (1975) 3, 209-218

- [180] D.J. Smith, M. Schulte, J.C. Bischof: *The Effect of Dimethylsulfoxide on the Water Transport Response of Rat Hepatocytes During Freezing*, Journal of Biomechanical Engineering 120 (1998) 5, 549-558
- [181] S. Sperling, I.G. Larsen: *Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro*, Acta Ophthalmologica 57 (1979) 5, 891-898
- [182] R. Spindler, B. Glasmacher: *Kryomikroskopie: Eine Methode zur Visualisierung von Gefrierprozessen*, KI Kälte-Luft-Klimatechnik 4 (2009), 28-31
- [183] R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Effect of Me₂SO on Membrane Phase Behavior and Protein Denaturation of Human Pulmonary Endothelial Cells Studied by In Situ FTIR Spectroscopy*, ASME, Journal of Biomechanical Engineering 131 (2009) 7, 074517-074519
- [184] R. Spindler, B. Glasmacher: *Cryopreservation of human pulmonary endothelial cells: Determination of osmotic parameters*, CryoLetters 31 (2010) 2, 189-190
- [185] R. Spindler, W.F. Wolkers, B. Glasmacher: *Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation*, CryoLetters 32 (2011) 2, 148-157
- [186] R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher: *Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation*, Cryobiology 64 (2012) 3, 250-260
- [187] A. Sputtek, E.-P. Horn, J. Schulte am Esch, P. Kühnl: *Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES) – Vom Laborversuch zur klinischen Anwendung*, Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 36 (2001) 2, S162-S164

- [188] A. Sputtek, P. Kühnl, A.W. Rowe: *Cryopreservation of Erythrocytes, Thrombocytes, and Lymphocytes*, *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 34 (2007) 4, 262-267
- [189] A. Sputtek: *persönliches Gespräch*, Institut für Mehrphasenprozesse, Hannover, 10.12.2008
- [190] P.L. Steponkus, D.V. Lynch: *Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation*, *J. Bioenerg. Biomembr.* 21 (1989) 1, 21-41
- [191] S.L. Stott, J.O.M. Karlsson: *Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy*, *Cryobiology* 58 (2009) 1, 84-95
- [192] A.K. Sum, J.J. de Pablo: *Molecular Simulation Study on the Influence of Dimethylsulfoxide on the Structure of Phospholipid Bilayers*, *Biophysical Journal* 85 (2003) 6, 3636-3645
- [193] H. Suzuki, T. Kumai, M. Matsuzaki: *Effect of Temperature Decline on the Cytoskeletal Organization of the Porcine Oocyte*, *J. Mamm. Ova Res.* 24 (2007) 3, 107-113
- [194] H. Takeda, S. Maruyama, J. Okajima, S.Aiba, A. Komiya: *Development and estimation of a novel cryoprobe utilizing the Peltier effect for precise and safe cryosurgery*, *Cryobiology* 59 (2009) 3, 275-284
- [195] K. Thangaraj, M. Palanisamy, R. Gobinathan and P. Ramasamy: *Substrate foreign atoms and ice nucleation activity*, *Journal of Colloid and Interface Science* 126 (1988) 2, 463-468
- [196] S. Thirumala, J.M. Forman, W.T. Monroe, R.V. Devireddy: *Freezing and post-thaw apoptotic behaviour of cells in the presence of palmitoyl nanogold particles*, *Nanotechnology* 18 (2007) 19, 1-12

- [197] M. Toner, E.G. Cravalho: *Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells*, J. Appl. Phys. 67 (1990) 3, 1582-1593
- [198] M. Toner: *Nucleation of ice crystals in biological cells*, In: Steponkus PL, Ed. *Advances in Low Temperature Biology*, JAI Press, London (1993) 2, 1-52
- [199] F.S. Trad, M. Toner, J.D. Biggers: *Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes*, Human Reproduction 14 (1998) 6, 1569-1577
- [200] H.S. Udaykumar, L. Mao: *Sharp-interface simulation of dendritic solidification of solutions*, International Journal of Heat and Mass Transfer 45 (2002) 24, 4793-4808
- [201] J.H. van't Hoff: *The role of osmotic pressure in the analogy between solutions and gases*, Zeitschrift für Physikalische Chemie 1 (1887), 481-508
- [202] R. Vichnewetsky: *A new stable computing method for the serial hybrid computer integration of partial differential equations*, AFIPS, Spring Joint Computer Conference (1968), 143
- [203] L. Wang, D.E. Pegg, J. Lorrison, D. Vaughan, P. Rooney: *Further work on the cryopreservation of articular cartilage with particular reference to the liquidus tracking (LT) method*, Cryobiology 55 (2007) 2, 138-147
- [204] L. Weng, W. Li, J. Zuo: *Kinetics of osmotic water flow across cell membranes in non-ideal solutions during freezing and thawing*, Cryobiology 61 (2010) 2, 194-203
- [205] J.E. Willson, D.E. Brown, E.K. Timmens: *A toxicologic study of dimethyl sulfoxide*, Toxicology and Applied Pharmacology 7 (1965) 1, 104-112

- [206] P. Wilson: *Physical basis of action of biological ice nucleation agents*, CryoLetters 15 (1994) 1, 119-126
- [207] H. Woelders, A. Chaveiro: *Theoretical prediction of “optimal” freezing programmes*, Cryobiology 49 (2004) 3, 258-271
- [208] W.F. Wolkers, S.K. Balasubramanian, E.L. Ongstad, H.C. Zec, J.C. Bischof: *Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells*, Biochimica et Biophysica Acta 1768 (2007) 3, 728-736
- [209] K. Wollhöver, Ch. Körber, M.W. Scheiwe, U. Hartmann: *Unidirectional freezing of binary aqueous solutions: an analysis of transient diffusion of heat and mass*, International Journal of Heat and Mass Transfer 28 (1985) 4, 761-769
- [210] B. Wowk: *Anomalous high activity of a subfraction of polyvinyl alcohol ice blocker*, Cryobiology 50 (2005) 3, 325-331
- [211] M. Wusteman, A. Busza, S. Boylan, A. Hayes, D. Pegg: *Ethylene glycol permeation and toxicity in the rabbit common artery*, Cryobiology 32 (1995) 5, 428-435
- [212] R.G. Wylie: *The freezing of supercooled water in glass*, Proc. Phys. Soc. B 66 (1953) 3, 241-254
- [213] Z.W. Yu, P.J. Quinn: *Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology*, Biosci. Rep. 14 (1994) 6, 259-281
- [214] K.E. Zachariassen, E. Kristiansen: *Review: ice nucleation and antinucleation in nature*, Cryobiology 41 (2000) 4, 257-279
- [215] K.E. Zachariassen, E. Kristiansen, S.A. Pedersen, H.T. Hammel: *Ice nucleation in solutions and freeze-avoiding insects – homogeneous or heterogeneous?*, Cryobiology 48 (2004) 3, 309-321

- [216] G. Zhao, D. Luo, D. Gao: *Universal model for intracellular ice formation and its growth*, AIChE Journal 52 (2006) 7, 2596-2606
- [217] A.I. Zhmakin: *Fundamentals of Cryobiology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2009)
- [218] M. Zhurova, E.J. Woods, J.P. Acker: *Intracellular ice formation in confluent monolayers of human dental stem cells and membrane damage*, Cryobiology 61 (2010) 1, 133-141

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ralf Spindler
 Geburtsdatum: 22.05.1971
 Geburtsort: Neuwied
 Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

1977-1979 Grundschole Emmendingen
 1979-1981 Grundschole Müllheim
 1981-1987 Realschole Müllheim
 1987-1988 Technisches Gymnasium Freiburg
 1988-1989 Rolfe Community High School, Iowa USA
 Abschluss: *College Preparatory School Diploma*
 1989-1991 Technisches Gymnasium Freiburg
 Abschluss: *Allgemeine Hochschulreife*

Wehrdienst:

1991-1992 Grundwehrdienst
 Militärgeschichtliches Forschungsamt, Freiburg

Hochschulausbildung:

1992-1994 Studium der Elektrotechnik an der Universität Stuttgart
 Vordiplom
 1994 Industriepraktikum: Z-Laser GmbH, Freiburg
 1995-1999 Studium der Elektrotechnik an der Universität Karlsruhe
 Abschluss: *Diplom-Ingenieur Elektrotechnik*
 2005-2007 Studium Biomedical Engineering an der Universität Aachen
 Abschluss: *Master of Science Biomedical Engineering*

Berufstätigkeit:

1999-2000 Philips-Semiconductors, Zürich, Schweiz
 Business Line Display Drivers
 2000-2005 Philips-Semiconductors, Zürich, Schweiz
 Business Line Cellular 3GSM
 2 Beförderungen: Senior Development Engineer
 seit 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
 Institut für Mehrphasenprozesse der
 Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
 Leitung: Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher

Hannover, im Juli 2012