

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation des
Universtätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. W. Sandmann

**Erhaltung endothelialer und glattmuskulärer Funktionen von
humanen Vena saphena magna Transplantaten**

- eine experimentelle Studie -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf

von

Murat Bas

2002

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.,
Dekan

Referent:

Univ.-Prof. Dr. med. Luther

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. Kojda

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
2.	Fragestellung	7
3.	Material und Methoden	8
3.1	Untersuchungsobjekte	8
3.2	Präparation	8
3.3	Konservierungslösungen	9
3.4	Versuchsaufbau	11
3.4.1	Apparatur und Instrumente	11
3.4.2	Nährmedium (Organbad)	12
3.5	Versuchsablauf	13
3.5.1	Kalibrierung	14
3.5.2	Einhängen	14
3.5.3	Äquilibrierung	14
3.5.4	Kontraktionstest	15
3.5.5	Dosis-Wirkungs-Kurven	15
3.5.6	Endotheltest	15
3.5.7	Fixierung	16
3.6	Auswertung	17
3.6.1	Funktionstests	17
3.6.2	Raster-Elektronen-Mikroskopie	18
3.7	Statistik	19
4.	Ergebnisse	19
4.1	Rezeptor-unabhängige kontraktile Eigenschaften	19
4.2	Rezeptor-abhängige kontraktile Eigenschaften	21
4.3	Dilatative Eigenschaften	26
4.4	Morphologische Auswertung	28
5.	Diskussion	35
5.1	Konservierungsmethoden	35
5.2	Konservierungsbedingungen / Konservierungslösung-Zusammensetzung	38
5.3	Rezeptor-unabhängige Vasokontraktion	44
5.4	Rezeptor-abhängige Vasokontraktion	45
5.5	Dilatative Eigenschaften	47
5.6	Morphologischer Endothelzustand	51
5.7	Schlußfolgerung	54
6.	Zusammenfassung	55
7.	Literaturverzeichnis	58

Abkürzungen

ACH	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ⁺⁺	Calciumion
Cl ⁻	Chloridion
cGMP	cyclischer Guanosinmonophosphat
EDRF	Endothelium dependent relaxing factor
EZR	Extrazellularraum
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Hydroxoniumion
IP ₃	Inositoltriphosphat
HES	Hydroxyethylstärke
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
IZR	Intrazellularraum
K ⁺	Kaliumion
KCL	Kaliumchlorid
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
Na ⁺	Natriumion
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffoxid
mN	mili Newton
PE	Phenylephrin
UW	University of Wisconsin -(solution)

1. Einleitung

Die Verpflanzung von allogenen Fremdgefäßen dient bei Fehlen autologer Rekonstruktionsmöglichkeiten der Erhaltung menschlicher Organe und Extremitäten. Der Einsatz allogener Venentransplantate zur Überbrückung mittel- und langstreckiger arterieller Verschlußprozesse ist seit Carrel {1908} bekannt und wird seitdem in sporadischen Zyklen international durchgeführt.

Obwohl an dieser Gewebetransplantation seit nahezu 100 Jahren gearbeitet wird, hat sich erst kürzlich die Erkenntnis durchgesetzt, daß auch bradytrophe Gewebe, wie die allogene Vene, eine hohe und unbedingt behandlungsbedürftige Antigenität besitzen {Guthrie 1908, Calhoun 1977, Ochsner 1984}. Mit der Einleitung einer adäquaten Immunsuppression haben sich die Transplantationsergebnisse wesentlich verbessert und erreichen eine Offenheitsrate bis zu 80 % nach einem Jahr {Blaheta 1998, Azuma 1999}. Damit unterscheidet sich das Verfahren kaum mehr von der autologen Venenverpflanzung und kann klinisch bei Fehlen eigenen gesunden Gefäßersatzmaterials empfohlen werden. Die immunologisch gesteuerte allogene Venentransplantation, deren Effizienz sich bei uns an 29 Patienten erwiesen hat, bildet die Grundlage für die vorliegende experimentelle Konservierungsstudie.

Die Konservierung und Preservation der allogenen Venen sind bisher nicht standardisiert. So kennzeichnen heute vielfältige Verfahren die Unsicherheit und den Empirismus der gefäßtransplantierenden Zentren. Die Notwendigkeit einer suffizienten Preservation der Transplantate für 1-2 Tage ergibt sich aus organisatorischen Aspekten des klinischen Alltags und insbesondere vor dem Hintergrund, daß kryokonservierte Präparate wegen Endothelnekrose, Intimaablösung und fibrotischer Degeneration nur beschränkte Verbreitung in der Transplantationsmedizin gefunden haben {Boeken 1993, Bujan 2000}. Auch andere Konservierungsverfahren, wie die Bestrahlung der Transplantate, Lyophilisierung oder die Formalin- bzw.

Glutaraldehydfixierung haben aufgrund ihrer geringen Effizienz oder der Gewebetoxizität nur noch historische Bedeutung {Stockmann 1974, Langhammer 1987}.

In einer von Langhammer {1987} durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, daß außer autologem Blut nur Konservierungslösungen mit niedrigem Gehalt an Natriumionen einen befriedigenden Erhaltungszustand des Venentransplantats gewährleisten. Zu diesen Lösungen gehört neben HTK-Bretschneider-Lösung auch die in letzter Zeit ubiquitär verwandte UW-Belzer-Lösung. Die Methodik dieser Studie beschränkte sich allerdings auf die pH-Wertmessung des Endothels als Ausdruck von vitalen Stoffwechselfvorgängen und eine auf histomorphologische Analyse.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Klärung des optimalen Erhaltungszustandes und damit des günstigsten Transplantationszeitpunktes eines allogenen Venentransplantats. Hierzu wurden frische humane Vena saphena magna-Transplantate in der HTK-Lösung, bzw. in der UW-Lösung bis zu 96 Stunden konserviert. Neben dem histomorphologischen Endothelstatus im Laufe der Konservierungszeit wurden im Organbad Funktionstests der Kontraktilität und des Relaxationsvermögens durchgeführt.

2. FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Klärung des optimalen Erhaltungszustandes und damit des günstigsten Transplantationszeitpunktes eines allogenen Venentransplantats. Hierzu ergaben sich folgende zu klärende Fragen:

1. Durch welche Methoden und Versuchsabläufe kann die Biostabilität humaner Venensegmente während der Konservierungszeit geprüft werden ?
2. Unter welchen Bedingungen sind humane Venensegmente am optimalsten zu konservieren ?
3. Welche der Konservierungslösungen (UW vs. HTK) ist für eine Konservierung der humanen Vena saphena Transplantate über einen Zeitraum bis 96 h am besten ?
4. Bis zu welchem Zeitpunkt ist eine Biostabilität der Venentransplantate in der UW-Lösung bzw. der HTK-Lösung gewährleistet ?
5. Reagieren einzelne Komponenten des kontraktilen Apparates empfindlicher auf die Konservierung und sind diese Unterschiede abhängig von der Konservierungslösung ?
6. Treten während der Konservierung morphologische Endothelschäden auf, die in den jeweiligen Konservierungslösungen unterschiedlich ausgeprägt sind ?
7. Wie ist die Beziehung zwischen morphologischen und funktionellen Endothelstatus während der Konservierungszeit ?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsobjekte

Für die Untersuchung wurden 2 – 7 cm lange Segmente menschlicher Vena saphena magna verwendet. Die Venensegmente erhielten wir aus der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen von Bypass-Operationen an Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Eine Differenzierung der Venen nach Erkrankungen des Spenders wurde nicht vorgenommen. Intraoperativ befanden sich die Venensegmente 1 – 2 h in einer etwa 4°C kühlen heparinisierten (5000 IE) Kochsalzlösung. Mit der Übergabe wurden die vollständigen Segmente in 150 ml steriler UW-Belzer bzw. HTK Konservierungslösung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.2 Präparation

Die Vena saphena magna wurde von einem Herzchirurgen aus dem Bein des Patienten von kaudal nach kranial herauspräpariert. Anschließend wurde die herausgenommene Vene mit isotoner NaCl-Lösung durchgespült. Bis zum Einsetzen der Vene am Herzen wurde sie in einer kalten heparinisierten (5000 IE) NaCl-Lösung aufbewahrt. Nach einer Dauer von etwa 2 Stunden wurden die 2 – 7 cm langen, nicht benötigten, Venensegmente zur Verfügung gestellt, die dann in einem Behälter mit 150 ml kalter Lösung (UW bzw. HTK) konserviert und dann sofort ins Untersuchungslabor transportiert wurden. Hier wurde ein etwa 3 – 5 mm langer Abschnitt der Vene abgetrennt und zwecks weiterer Präparation in eine Krebs-Henseleit-Lösung (4°C) verbracht.

3.3 Konservierungslösungen

In Berücksichtigung der heute am gebräuchlichsten Konservierungslösungen in der Transplantationsmedizin untersuchten wir folgende Medien:

a) -UW-Belzer (University of Wisconsin solution).

Tab.1: Zusammensetzung der UW-Lösung (ViaSpan®)

Bestandteil	Konzentration [g/l]
Kaliumphosphat, Kaliumhydrogenphosphat	3,40
Kaliumhydroxid	5,61
Natriumhydroxid zur pH Einstellung (pH = 7,4)	29,50
Magnesiumsulfat Heptahydrat	1,23
Adenosin	1,34
Allopurinol	0,14
Gluthation/Gluthationbisulfid	0,92
Laktobionsäure	35,83
Raffinose Pentahydrat	17,83
modifizierte Hydroxyethylstärke	50,00
Dexamethason	0.016
Penizillin G	200.000 U/l
Insulin	40 U/l

Viaspan® ist eine klare bis hellgelbe, sterile, pyrogenfreie Lösung. Die Lösung hat eine berechnete Osmolarität von ca. 320 mOsM, eine Natriumkonzentration von 29 mmol/, eine Kaliumkonzentration von 125 mmol/l (intrinsic medium). Der pH-Wert beträgt, gepuffert mit Natronlauge (NaOH) 7,4 bei Raumtemperatur. Die Lösung enthält keinerlei Kalzium-und Chloridionen.

b) -HTK-Bretschneider (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat)

Tab.2: Zusammensetzung der HTK-Lösung (*CUSTODIOL*®)

Bestandteil	Konzentration [g/l]
Kaliumchlorid	0,6710
Kalium-Hydrogen-2-Ketoglutarat	0,1842
Natriumchlorid	0,8766
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	0,0022
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	0,8132
Histidin	27,9289
Histidinhydrochlorid-Monohydrat	3,7733
Tryptophan	0,4085
Mannitol	5,4651

Die HTK-Lösung besitzt eine Natriumkonzentration von 15 mmol/l, eine Kaliumkonzentration von 10 mmol/l und einen pH zwischen 7,02 bis 7,20. Die Osmolarität der HTK-Lösung nach Bretschneider beträgt 310 mOsM.

3.4. Versuchsaufbau

Der Aufbau und die Durchführung des Versuches werden zur Erleichterung der Transparenz dezidiert beschrieben:

3.4.1. Apperatur und Instrumente

Die experimentelle Anlage war wie folgt aufgebaut (siehe Abbildung 11 im Anhang):

- vier doppelwandige Organbäder (ca. 20 ml) aus Glas (Eigenbau des Labors).
- ein Umlaufthermostat (Fa. Haake, Typ NB22).
- vier Spannungsaufnehmer (Statham, USA).
- drei Verstärker (Fa. I.f.d. 2 Modelle des Typs TG 2/8, 1 Modell des Typs 19“ 12HAT).
- ein 12-Kanal Farbdrucker (LPD 12, Linseis, Sell, BRD).
- ein doppelwandiges Vorratsgefäß (ca. 2 l) aus Kunststoff für die Nährlösung, ebenfalls mit Anschluß an den Thermostatkreislauf (Eigenbau des Labors).

Das Instrumentarium bestand aus mehreren Scheren, Federscheren, Pinzetten, Pipetten, einem Skalpell, mehreren Petrischalen, Spritzen mit Kanülen, und Korkplatten (zum Aufspannen der zur Fixierung bestimmten Venensegmente). Ferner wurden allgemeine Einrichtungen des Labors wie Waagen, pH-Meter, die Destillieranlage sowie Kühlschränke benutzt. Zum Einhängen der Gefäßringe ins Organbad dienten triangelförmige Haken aus Edelstahl (10-7-10 mm). Die Verbindung zwischen Haken und Spannungsaufnehmer wurde mit textilem Faden (Synthofil[□], 1,5 metric 4/0 USP, Braun-Melsungen) hergestellt.

3.4.2. Nährmedium (Organbad) während der Messung

Als physiologisches Nährmedium während der Messung diente eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung (KHP), die täglich frisch angesetzt wurde und als extrinsic Medium folgende Zusammensetzung aufwies.

Tab.3: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

Bestandteile	Konzentration [mM/l]
K^+	5.87
Na^+	143.07
Cl^-	125.96
Ca^{2+}	1.6
Mg^{2+}	1.18
HCO_3^-	25.00
$H_2PO_4^-$	1.18
SO_4^{2-}	1.18
Glucose	5.05

Zur Herstellung wurden NaCl (13,8 g), Glucosemonohydrat (2,2 g) und $NaHCO_3$ (4,2 g) als Trockensubstanzen abgewogen. Weitere Mineralien wurden aus den folgend aufgeführten vier kühl gelagerten Stammlösungen bezogen:

Stamm 1	KH_2PO_4	0,235 mol/l
Stamm 2	KCl	0,939 mol/l
Stamm 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,235 mol/l
Stamm 4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,320 mol/l

Von jeder Stammlösung wurden 10 ml zu den bereits in kapp 2 Litern gelösten Mineralien gegeben. Zu der Lösung wurde noch 10 μmol Indomethazin (5.36 mg in 1500 μl Ethanol) hinzugefügt. Anschließend wurde die Nährlösung auf 2 Liter aufgefüllt und bei Raumtemperatur mittels 10- % iger HCl-Lösung, unter Kontrolle eines pH-Meters ein Wert von 7,35 – 7,45 eingestellt. Alle weiteren verwendeten Substanzen (Phenylephrin, Azetylcholin, Glutaraldehyd) stammen von der Firma Sigma, Deisenhofen, und der Firma Merck, Darmstadt und entsprachen der Qualitätsstufe pro analysi.

3.5 Versuchsablauf

Die Versuche liefen unabhängig von der Konservierungslösung weitgehend identisch nach folgendem Schema ab:

- Kalibrierung
- Einhängen
- Äquilibrierung
- Kontraktionstest
- Endotheltest
- Dosis-Wirkungs-Kurven
- Fixierung

Zwischen den einzelnen Versuchsschritten wurde jeweils mindestens 3 mal die Pufferlösung im Organbad frisch ersetzt und, wenn nötig, die Vorspannung korrigiert.

3.5.1. Kalibrierung

Zu Beginn des Versuchsablaufs wurde jeden Tag das Messgerät und der Verstärker durch Kalibrierung eingestellt. Die Einstellung der Vorspannung auf 1 g erfolgte mittels Einhängen von 1 g schweren Gewichten am Spannungsaufnehmer und durch Abgleichung der Verstärker auf „0“ (null). Anschließend wurde nach dem Abhängen der Gewichte der Spannungsaufnehmer durch Drehung des Zahnrades auf „0“ eingestellt, so daß nach dem Einhängen der Gefäße „0“ = 1 g Vorspannung bedeutete.

3.5.2. Einhängen

Nach Abschluß der Präparation wurden die gewonnenen Gefäßringe unter größtmöglicher Schonung der Intima auf jeweils 2 Triangel aufgezogen und in die mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten, begasten (Carbogen) und auf konstant 37°C temperierten Organbäder eingehängt. Dabei wurde die untere Triangel an einem Haken am unteren Ende eines Edelstahlstabes befestigt und die obere Triangel mittels des Synthofilfadens vertikal mit dem Spannungsaufnehmer verbunden. Hierbei war darauf zu achten, daß man den Synthofilfaden beim Befestigen an dem Spannungsaufnehmer nicht zu stramm (Endothelbeschädigungsgefahr), aber aus technischen Gründen auch nicht zu locker ziehen durfte (eine zu lockere Einspannung konnte nicht justiert werden). Nach dem Einhängen wurde die Vorspannung durch Justierung am Zahnrad des Spannungsaufnehmers eingestellt.

3.5.3. Äquilibration

Während dieser 30 - 40 minütigen Phase wurden die Gefäßsegmente an die 1 g Vorspannung adaptiert. Während dieser Phase wurde 3 mal die Nährlösung durch begastes Medium frisch ersetzt, wobei sich nach dem letzten Austausch genau 10 ml im Organbad befanden. Nach jeder Auswaschung wurde gegebenenfalls die Vorspannung korrigiert. Das Ende der Äquilibrationsphase stellte jeweils der Nullabgleich dar, bei dem der 1 g-Vorspannungsausgleich auf die Drucker-Nulllinie zurückgestellt wurde. Diese Nulllinie auf der Basis der Gefäßvor-

spannung von 1 g diente während des ganzen Versuchs als Bezugspunkt und wurde zwischen den einzelnen Versuchsschritten bei zu starker Abweichung wieder eingestellt. Erst wenn die Vorspannung konstant eingehalten wurde, konnten weitere Versuchsschritte geführt werden.

3.5.4. Kontraktionstest

Jedes Gefäßsegment wurde zunächst auf seine kontraktile Eigenschaften hin untersucht. Dazu wurde zur Überprüfung der generellen Kontraktionsfähigkeit der glattmuskulären Gefäßwand (Rezeptor-unabhängig) die Kaliumkonzentration der Organbadlösung mit 80 mM KCl erhöht. Gefäßsegmente, die von vornherein auf 80 mmol KCl keinerlei Reaktion zeigten, wurden verworfen und der Versuch mit einem weiteren Venensegment wiederholt. Erst bei einem negativen Kontrollversuch wurde die gesamte Vene verworfen und damit aus der Wertung ausgeschlossen. Von insgesamt 49 Venensegmenten traf dies bei 17 Venen zu, die dann von vornherein ausgeschlossen wurden. Nach dem positiven Kontraktionstest folgte erneut eine Äquilibrationsphase mit dem Ziel der Wiedereinstellung der Vorspannung, wobei die Organbäder mehrfach mit Krebs-Henseleit-Puffer ausgewaschen werden mußten, was einen Zeitraum von 30 bis 60 min einnahm.

3.5.6 Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Dosis-Wirkungs-Versuche wurden kumulativ mit Phenylephrin (0,2, 2 und 20 μM) durchgeführt. Nachdem eine Vasokontraktion durch 0,2 μM Phenylephrin erfolgte, wurde kumulativ 2 μM und dann 20 μM Phenylephrin ins Organbad hinzugefügt.

3.5.4. Endotheltest

Der pharmakologische Nachweis einer dilatativen Reaktion begann stets mit einer Vorkontraktion der Gefäßsegmente mittels 0,2 μM Phenylephrin. Auf die vorkontrahierten Gefäßsegmente wurde zwecks Einleitung der Vasodilatation jeweils Acetylcholin pipetiert (Endkonzentration 1 μM). Da die Wirkungsdauer des Acetylcholins sehr kurz ist, erfolgte nur eine

kurzfristige Dilatation. Mit dem Nachlassen der Wirkung des Acetylcholins stellte sich die Spannung der Venensegmente wieder im Bereich der Vorspannung ein.

3.5.7 Fixierung

Neben den umfangreichen Funktionstests erfolgte eine morphologische Begutachtung der konservierten humanen Venensegmente in den jeweiligen Lösungen. Zu diesem Zweck wurden die Venensegmente nach der initialen 3 h– Messung und nach einer Konservierungszeit von 24 h, 48 h, 72 h und 96 h im Anschluß an die Funktionstests fixiert. Die Fixierung begann mit der Vorbereitung der dafür notwendigen Materialien. Dazu wurden zunächst die Gefäßsegmente auf Korkplatten (\varnothing 1.5 cm) aufgespannt. Vom im Tiefkühlfach aufbewahrten tiefgefrorenen Glutaraldehyd wurden etwa 5 ml aufgetaut (Dauer bei Raumtemperatur etwa 30 min). Als Fixierungsbehälter standen kleine (10 ml) Glasbehälter mit zugehörigem Deckel zur Verfügung, die dann entsprechend zur anonymisierten Kennzeichnung nummeriert wurden. In einer Petrischale wurde etwa 50 ml Krebs-Henseleit-Lösung eingefüllt. Nach dieser Vorbereitungsphase wurden die Gefäßsegmente aus den Organbädern herausgeholt und in die Petrischalen, die als Zwischenstation dienten, eingelegt. Im weiteren Schritt wurden die Gefäßsegmente vorsichtig mittels einer feinen Schere längs aufgeschnitten und auf den Korkplatten aufgerollt. Die aufgerollten Gefäßsegmente wurden dann jeweils mit zwei Kanülenspitzen dicht an den Gefäßrändern vorsichtig fixiert. Dieser Präparationsschritt verlangte höchste Konzentration, da die Gefahr einer Endothelverletzung groß war. Die Korkplatten mit den aufgespießten Gefäßsegmenten wurden dann sofort (Vermeidung der Austrocknung der Gefäßoberfläche) in die mit Glutaraldehyd gefüllten Glasbehälter hinein gesetzt und zur weiteren Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C deponiert.

Es wurde genauestens dokumentiert, wann eine Vene in welcher Konservierungslösung fixiert wurde. Zu diesem Zweck wurden die Glasbehälter mit den fixierten Venensegmenten alle nummeriert. Die fixierten Präparate wurden gesammelt und in die Laboratorien des Patholo-

gischen Instituts der Heinrich-Heine-Universität zwecks histologischer Begutachtung gebracht. Bis zur weiteren Bearbeitung der Präparate durch die medizinisch-technischen Laboratoriumsassistenten des Pathologischen Institutes wurden die Präparate tiefgefroren. Die morphologische Begutachtung des Endothelstatus der Gefäßsegmente erfolgte geblindet mittels Rasterelektronenmikroskopie (625-fache Vergrößerung). Die Präparate wurden verdeckt befundet, das heißt der Untersucher hatte keine Kenntnis in welcher Konservierungslösung die Probe gelagert worden war. Von jedem Präparat wurden anschließend zwecks Dokumentation 206-fach vergrößerte Fotos gemacht

3.6 Auswertung

3.6.1 Funktionstests

Die Änderungen der Gefäßquerschnitte wurden isotonisch über die Spannungsaufnehmer aufgenommen und verstärkt vom Drucker aufgezeichnet. Dabei wurden die vom Vasotonus abhängenden Veränderungen in der Einheit [g] aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde eine Nulllinie zwischen dem Tonus am Ende der Äquilibrationsphase (nach dem Nullabgleich) und dem stabilen Tonus am Ende des Versuches nach dem letzten Auswaschvorgang gezogen. Mußte die Vorspannung im Verlauf des Versuchs korrigiert werden, so wurde die Nulllinie bis zum Tonus kurz vor der Korrektur geführt und am korrigierten Nullpunkt erneut angesetzt. Die durch Acetylcholin induzierte Gefäßrelaxation wurde nach Ausmessen jeweils prozentual zur Vorkontraktion mit Phenylephrin (0.2 μM) angegeben (Abbildung 2).

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die in der Einheit [g] gemessenen Werte in die Einheit [mN] umgerechnet. Ergebnisse beider Konservierungslösungen wurden dann in Tabellen (Tab. 4 – 9) gegenübergestellt und statistisch ausgewertet.

Um die Veränderungen der kontraktiven Eigenschaften der Venensegmente in den jeweiligen Konservierungslösungen im Laufe der Konservierungszeit relativ zu vergleichen, wurden die

gemessenen Werte mit der Einheit [mN] in prozentuale Relation gestellt. Dabei wurden die initial gemessenen Werte (bei 3 h) als 100 % Vasotonus betrachtet und die Abweichungen vom initial gemessenen Wert im Laufe der Konservierungszeit als prozentuale Abweichung ausgewertet. Die hierbei erzielten Ergebnisse wurden auf ihre Signifikanz hin untersucht und in entsprechenden Graphen (Abb. 1 – 5) dargestellt.

3.6.2 Raster-Elektronen-Mikroskopie

Für die morphologische Untersuchung der Präparate wurden aus den Gefäßsegmenten von Laboratoriumsassistenten mittels eines Mikrotoms feine Gewebsschnitte hergestellt und auf einem Objektträger übertragen. Die fachkundliche Begutachtung (Gefäßwände, Endothelstatus) erfolgte durch eine Pathologin (Fr. Dr. med. Reinecke) des hiesigen Pathologischen Institutes mittels Raster-Elektronenmikroskopie bei einer 625- bzw. 1025 facher Vergrößerung. Jedes untersuchte Präparat wurde dann mit einer 206-bzw. 825 facher Vergrößerung photographiert. Zur Beurteilung des Endothelstatus wurde ein Punkte-System (Score 1 – 4) eingeführt, die sich am prozentual erhaltenen Endothelstatus orientierte:

Punkte- System:

Score 1 = kein Endothel erkennbar (0-25 %)

Score 2 = vereinzelt Endothel erkennbar (25-50 %)

Score 3 = großflächig Endothel erkennbar (50-75 %)

Score 4 = Endothel erhalten (75-100 %)

3.7 Statistik

Die Mittelwerte (\bar{x}) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) wurden nach der Standardmethode von Sachs (1978) berechnet. Die Veränderungen am Vasotonus der Gefäßsegmente im Laufe der Konservierungszeit [h], erfasst jeweils durch die Versuchsabläufe, wurden mit ANOVA und dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz ($p < 0.05$) untersucht. Für die statistischen Berechnungen stand ein Statistik-Programm (Graph Pad Prism-2) zur Verfügung.

4. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden von 49 Vena saphena magna-Präparaten 27 Venen konserviert und experimentell untersucht. Hiervon wurden 14 Venen in der UW-Lösung und 13 in der HTK-Lösung konserviert.

4.1. Rezeptor-unabhängige Vasokontraktion der Gefäßsegmente

Bei der prozentualen Veränderung des Vasotonus im Laufe der Konservierungszeit zeigen die Ergebnisse, daß die KCl induzierte Vasokontraktion im Laufe der Konservierungszeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungen aufweist (Abb.1). Nach einer statistischen Analyse mittels Two-Way-Anova konnte festgestellt werden, daß die Vasokontraktion von der Konservierungszeit signifikant abhängt ($P < 0.0001$), aber nicht von der Art der Konservierungslösung ($p = 0.082$). Nach 24 h Konservierung zeigten beide Venengruppen vergleichbare Rezeptor-unabhängige Vasokontraktionen (UW 88 %, HTK 89 %). Deutlich bessere Konservierungseigenschaften zeigte die UW-Lösung jedoch nach 48 h (72 %), gegenüber der HTK-Lösung (60 %). Während der weiteren Konservierungszeit (72 h, 96 h) nahm die Vasokontraktion in beiden Lösungen stetig ab (UW 48 %, bzw. 33 %; HTK 39 %, bzw. 32 %).

Tab.4: Kontraktile Antwort der humanen Venensegmente durch 80 mM KCl nach Konservierung in UW oder HTK, entsprechend der Zeitperioden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in mN des maximal erreichten Vasotonus mit die Standardabweichung (SEM) und die Anzahl der untersuchten Gefäßsegmente (n) pro Zeiteinheit [h]. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluß der Konservierungslösung auf die Kontraktionsfähigkeit ($p=0.082$), während die Konservierungszeit die Kontraktion drastisch reduzierte ($p<0.0001$, Two-Way-Anova).

Zeit [h]	HTK [mN]	n	UW [mN]	n
3	38.10±5.70	13	59.90±12.08	14
24	33.88±5.89	13	52.64±10.70	14
48	22.68±5.40	13	43.21±12.18	14
72	14.93±4.61	11	28.58± 7.76	13
96	12.08±4.62	11	19.84± 9.23	11

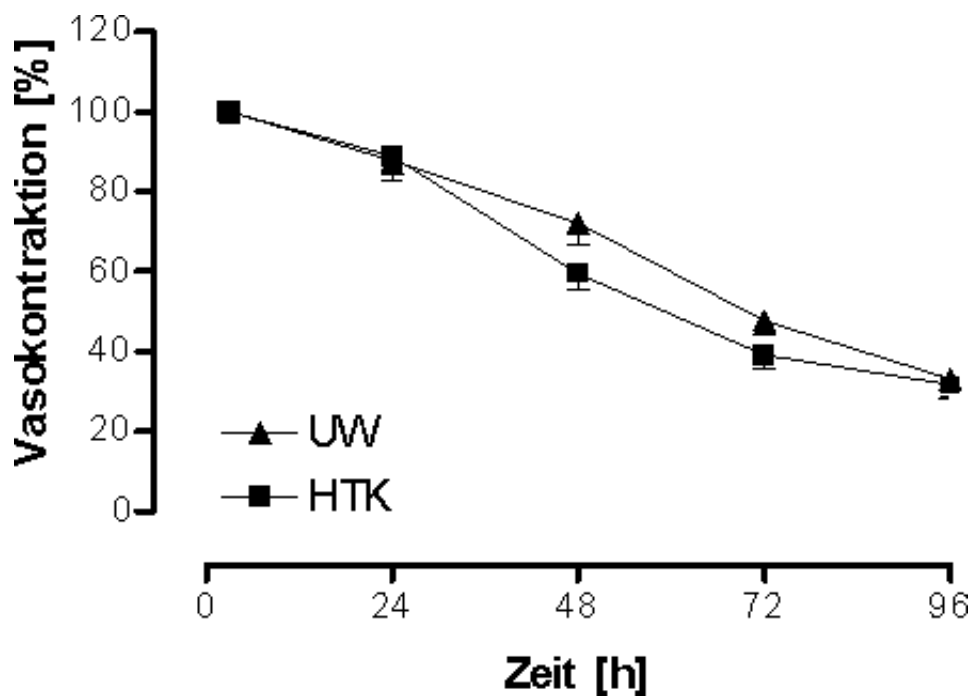


Abb.1: Dargestellt ist die KCl- induzierte Vasokontraktion der Gefäßsegmente der UW-Lösung und der HTK-Lösung in Prozent, wobei die Vasokontraktion der ersten 3 Stunden mit 100 % festgelegt wurde.

4.2. Rezeptor-abhängige Vasokonstriktion der Gefäßsegmente

Auf die kumulative Steigerung der PE-Dosis erfolgte eine dosisabhängige Vasokonstriktion über α_1 -Rezeptoren der Venensegmente (Tab.8, Abb.5). In beiden Lösungen war eine Steigerung der Vasokonstriktion mit der Zunahme der PE-Dosis zu beobachten. In den UW-Venen zeigte sich bei 0.2- und 2 μM PE in den ersten 48 h der Konservierungszeit eine stärkere Vasokonstriktion als in den Venensegmenten der HTK-Gruppe, die bei 0.2 μM PE auch statistisch signifikant ($p < 0.05$) war. Bei 0.2 μM PE konnte nach 24 h Konservierung in der UW-Lösung die Vasokonstriktion noch zu 97 % erhalten werden, wogegen die HTK-Venen zu diesem Zeitpunkt nur noch 63 % Vasokonstriktion zeigten. Nach 48 h betrug die Vasokonstriktion in der UW-Lösung 66 % und in der HTK-Lösung 58 % (Abb.2). Diese Unterschiede nahmen nach 72 h Konservierung, mit 33 % in der UW-Lösung und 30 % in der HTK-Lösung ab (Abb.2). Ähnliche Ergebnisse, die jedoch nicht signifikant waren, wurden auch bei der 2 μM PE-induzierten Vasokonstriktion erzielt. Die durch 2 μM PE induzierte Kontraktionskraft blieb in der UW-Lösung nach 24 h zu 82 % und nach 48 h zu 55 % erhalten. Bei Konservierung in der HTK-Lösung lagen diese Werte bei nur 75 % nach 24 h und 49 % nach 48 h. ($p = 0.379$). Nach 96 h zeigten die UW-Venen bei 2 μM PE noch 28 % Vasokonstriktion gegenüber 19 % in der HTK ($P = 0.14$). Die Vasokonstriktion der Venensegmente wurde v.a. bei niedriger PE-Dosis (0.2 μM) in der UW-Lösung statistisch signifikant besser erhalten als in der HTK-Lösung (Abb.2). Die maximale Vasokonstriktion wurde in beiden Lösungen durch 20 μM PE ausgelöst. Hier gab es im Laufe der gesamten Konservierungszeit zwischen den beiden Lösungen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede (Abb.4). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Konservierung der humanen Vena saphena magna-Transplantaten in der HTK-Lösung zu einer stärkeren Desensibilisierung der α -mimetischen Stimulation führt als in der UW-Lösung. Die durch PE induzierte α -rezeptorabhängige Vasokonstriktion wird in den ersten 48 h in der UW-Lösung besser konserviert als in der HTK-Lösung.

Tab.5: Kontraktile Antwort der humanen Venensegmente nach Gabe von 0.2 μM Phenylephrin in den jeweiligen Konservierungslösungen HTK- oder UW- Lösung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in mN des maximal erreichten Vasotonus mit die Standardabweichung (SEM) und die Anzahl der untersuchten Gefäßsegmente (n) pro Zeiteinheit [h]. Neben einer signifikant drastischen Abnahme der Kontraktionsfähigkeit im Laufe der konservierungszeit ($p < 0.0001$), zeigten sich auch zwischen den Konservierungslösungen signifikante Unterschiede auf die Kontraktionsfähigkeit ($p < 0.0055$, Two-Way-Anova).

Zeit [h]	HTK [mN]	n	UW [mN]	n
3	4.57±1.77	13	11.69±3.24	14
24	2.87±1.57	13	11.29±3.63	14
48	2.65±1.96	13	7.66±3.04	14
72	1.38±0.88	11	3.83±2.55	13
96	0.10±0.10	11	2.26±1.57	11

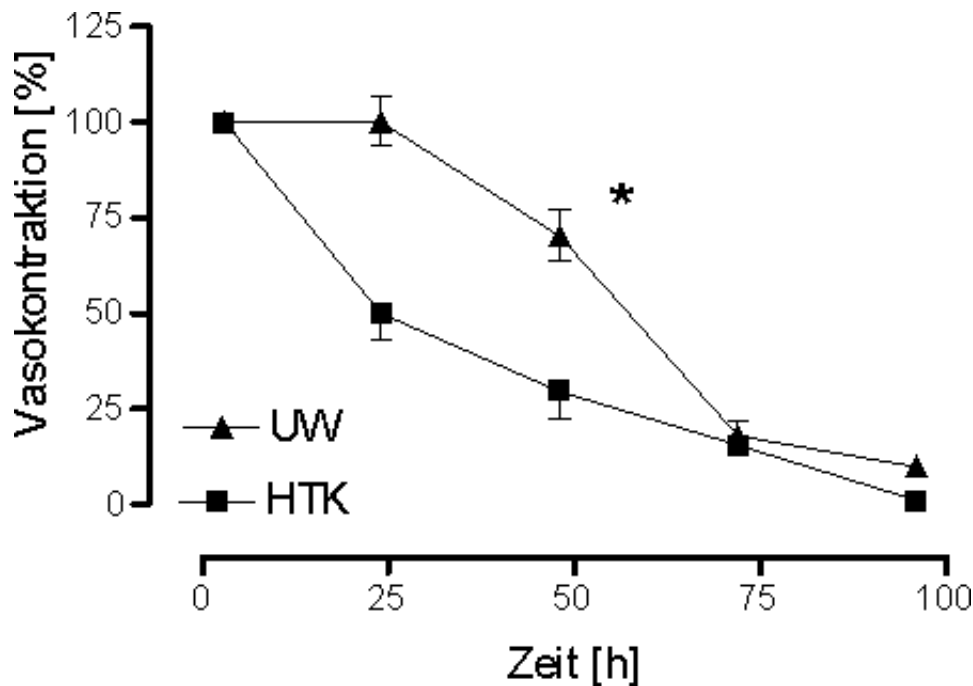


Abb.2: Auswirkung der Konservierung auf humane Venensegmente in den jeweiligen Konservierungslösungen UW- und HTK-Lösung bis 96 h. Dargestellt ist die durch 0.2 μM Phenylephrin induzierte Vasokontraktion der Gefäßsegmente der UW-Lösung und der HTK-Lösung in Prozent [%], entsprechend den Zeitintervallen der Messung. Die initiale Messung bei 3 h wurde mit 100 % festgelegt.

Tab.6: Kontraktile Antwort der humanen Venensegmente nach Gabe von 2 μM Phenylephrin in den jeweiligen Konservierungslösungen HTK- oder UW- Lösung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in mN des maximal erreichten Vasotonus mit die Standardabweichung (SEM) und die Anzahl der untersuchten Gefäßsegmente (n) pro Zeiteinheit [h]. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluß der Konservierungslösung auf die Kontraktionsfähigkeit ($p=0.14$), während die Konservierungszeit die Kontraktion drastisch reduzierte ($p<0.0001$, Two-Way-Anova).

Zeit [h]	HTK [mN]	n	UW [mN]	n
3	15.71 \pm 4.52	13	35.65 \pm 10.4	14
24	11.78 \pm 5.21	13	29.36 \pm 9.33	14
48	7.76 \pm 4.71	13	19.64 \pm 6.09	14
72	5.40 \pm 3.54	11	13.94 \pm 6.58	13
96	2.95 \pm 1.96	11	10.02 \pm 5.40	11

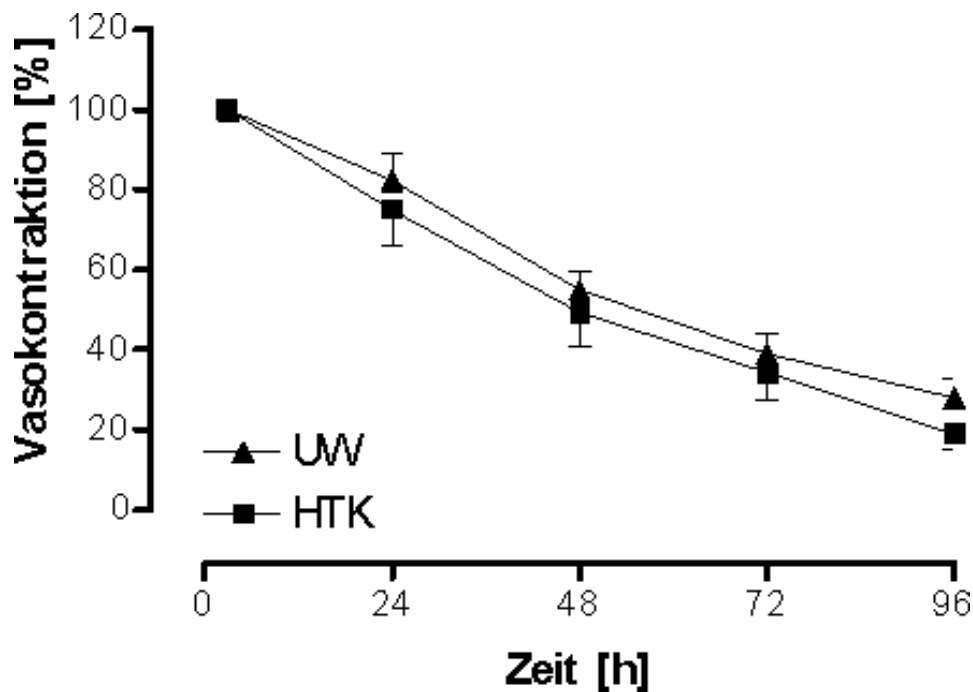


Abb.3: Auswirkung der Konservierung auf humane Venensegmente in den jeweiligen Konservierungslösungen UW- und HTK-Lösung bis 96 h. Dargestellt ist die durch 2 μM Phenylephrin induzierte Vasokontraktion der Gefäßsegmente der UW-Lösung und der HTK-Lösung in Prozent [%], entsprechend den Zeitintervallen der Messung. Die initiale Messung bei 3 h wurde mit 100 % festgelegt.

Tab.7: Kontraktile Antwort der humanen Venensegmente nach Gabe von 20 μM Phenylephrin in den jeweiligen Konservierungslösungen HTK- oder UW- Lösung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in mN des maximal erreichten Vasotonus mit die Standardabweichung (SEM) und die Anzahl der untersuchten Gefäßsegmente (n) pro Zeiteinheit [h]. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluß der Konservierungslösung auf die Kontraktionsfähigkeit ($p=0.57$), während die Konservierungszeit die Kontraktion drastisch reduzierte ($p<0.0001$, Two-Way-Anova).

Zeit [h]	HTK [mN]	n	UW [mN]	n
3	27.50±6.78	13	59.22±13.55	14
24	23.76±6.58	13	48.22±12.77	14
48	14.93±6.19	13	38.20±11.88	14
72	11.98±4.32	11	28.97±10.31	13
96	9.43±4.62	11	19.35±10.12	11

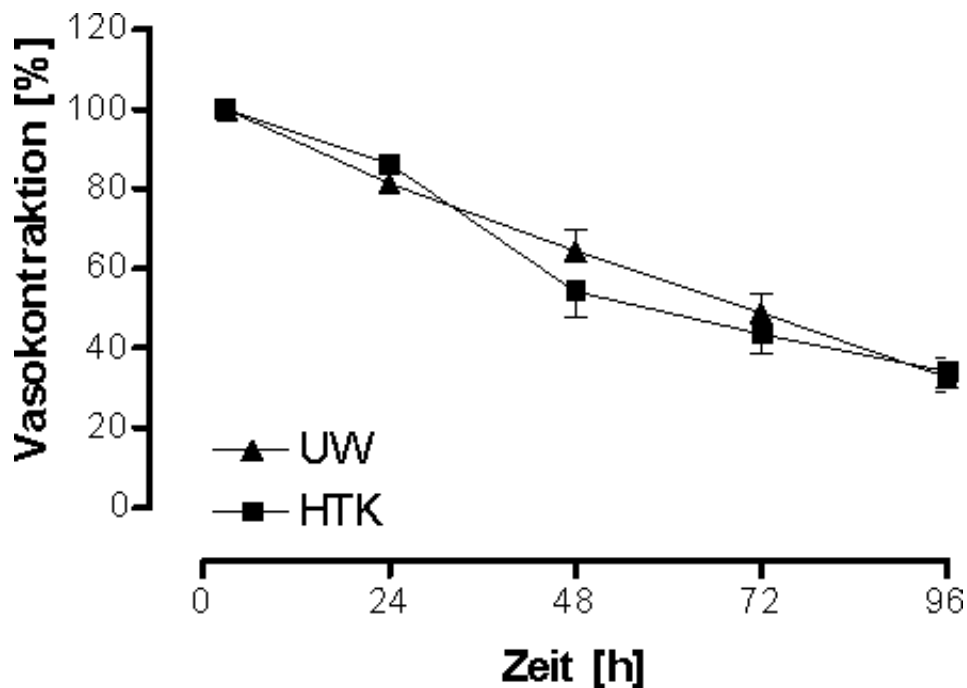


Abb.4: Auswirkung der Konservierung auf humane Venensegmente in den jeweiligen Konservierungslösungen UW- und HTK-Lösung bis 96 h. Dargestellt ist die durch 20 μM Phenylephrin induzierte Vasokontraktion der Gefäßsegmente der UW-Lösung und der HTK-Lösung in Prozent [%], entsprechend den Zeitintervallen der Messung. Die initiale Messung bei 3 h wurde mit 100 % festgelegt.

Phenylephrin-Dosis-Wirkungsbeziehung

Tab.8: Kontraktile Antwort von humanen Venensegmente nach Gabe von 0.2 μM , 2 μM und 20 μM Phenylephrin nach Konservierung in HTK und UW. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichung in mN bei verschiedenen Segmenten [n] pro Zeiteinheit [h]. Während der Konservierungszeit zeigte die Erhöhung der Phenylephrin-Dosis eine signifikante Zunahme der Vasokontraktion ($p < 0.0001$).

Zeit		3 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0.2 μM	UW (n=14)	11.69 \pm 3.24	11.29 \pm 3.63	7.66 \pm 3.04	3.83 \pm 2.55	2.26 \pm 1.57
	HTK (n=13)	4.57 \pm 1.77	2.87 \pm 1.57	2.65 \pm 1.96	1.38 \pm 0.88	0.10 \pm 0.10
2 μM	UW (n=14)	35.65 \pm 10.4	29.36 \pm 9.33	19.64 \pm 6.09	13.94 \pm 6.58	10.02 \pm 5.40
	HTK (n=13)	15.71 \pm 4.52	11.78 \pm 5.21	7.76 \pm 4.71	5.40 \pm 3.54	2.95 \pm 1.96
20 μM	UW (n=14)	59.22 \pm 13.55	48.22 \pm 12.77	38.20 \pm 11.88	28.97 \pm 10.31	19.35 \pm 10.12
	HTK (n=13)	27.50 \pm 6.78	23.76 \pm 6.58	14.93 \pm 6.19	11.98 \pm 4.32	9.43 \pm 4.62

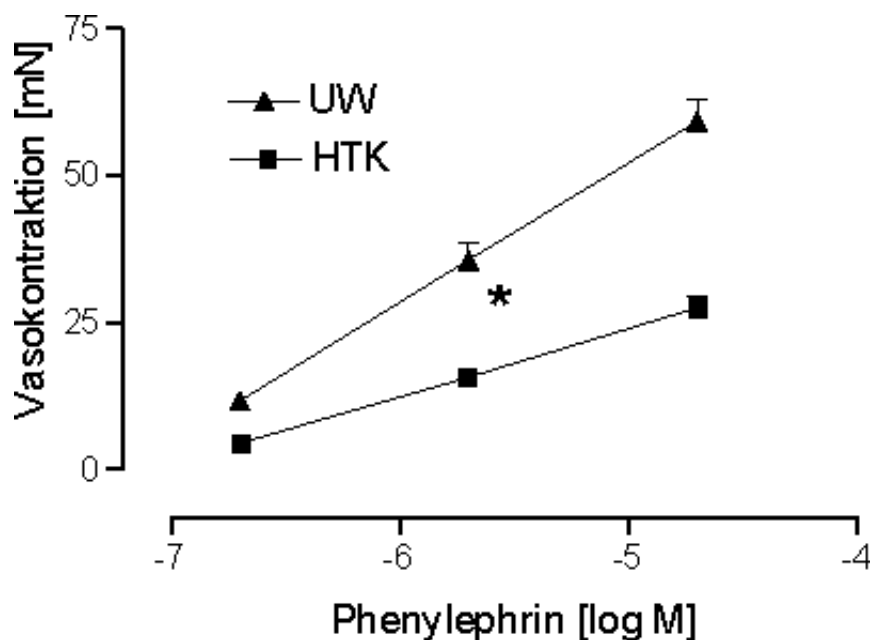


Abb.5: Auswirkung der kumulativen Phenylephrin- Dosissteigerung auf die Vasokonstriktion der Venensegmente in den Konservierungslösungen UW- und HTK- Lösung. Dargestellt ist die dosisabhängige Veränderung (logM) bei der initialen Messung nach 3 h Konservierungszeit.

4.1 Dilatative Eigenschaft

Die endothelabhängige Vasodilatation, induziert mittels Acetylcholin, war schwach und erreichte maximal nur 39 ± 21.6 %. Bei Konservierung in der UW- Lösung zeigte sich bereits nach 3 h eine bessere Preservation der Vasodilatation, die auch nach 24 h günstiger als in der HTK-Lösung ausfiel. Nach 48 h war dieser Trend statistisch signifikant ($p < 0.0001$). Während auch nach 72 h Konservierung in der UW-Lösung noch eine endothelabhängige Vasodilatation zu beobachten war, fehlte diese Reaktion bei Lagerung der Vene in HTK-Lösung. Nach 96 h waren in beiden Lösungen keine Vasodilatationen der Venen vorhanden (Tab.9, Abb.6).

Tab.9: Durch $1\mu\text{M}$ Acetylcholin induzierte Vasorelaxation der Venensegmente nach Vorkontraktion. Dargestellt ist das dilatative Verhältnis in mN und Prozent mit die Standardabweichung in beiden Lösungen. Die Vasodilatation (mN) hängt signifikant von der Konservierungslösung und von der Konservierungszeit ab ($p < 0.0001$).

Zeit	HTK			UW		
	Vasorelaxation		n	Vasorelaxation		n
	[mN]	[%]		[mN]	[%]	
3 h	-2.95 ± 1.08	19.75 ± 5.21	4	-8.84 ± 8.84	34.5 ± 34.5	2
24 h	-1.96 ± 1.38	16.00 ± 3.00	4	-5.40 ± 1.67	24.8 ± 10.8	6
48 h	0	0	4	-1.45 ± 0.59	39.7 ± 21.6	6
72 h	0	0	4	-0.30 ± 0.30	10.0 ± 0.0	6
96 h	0	0	4	0	0	6

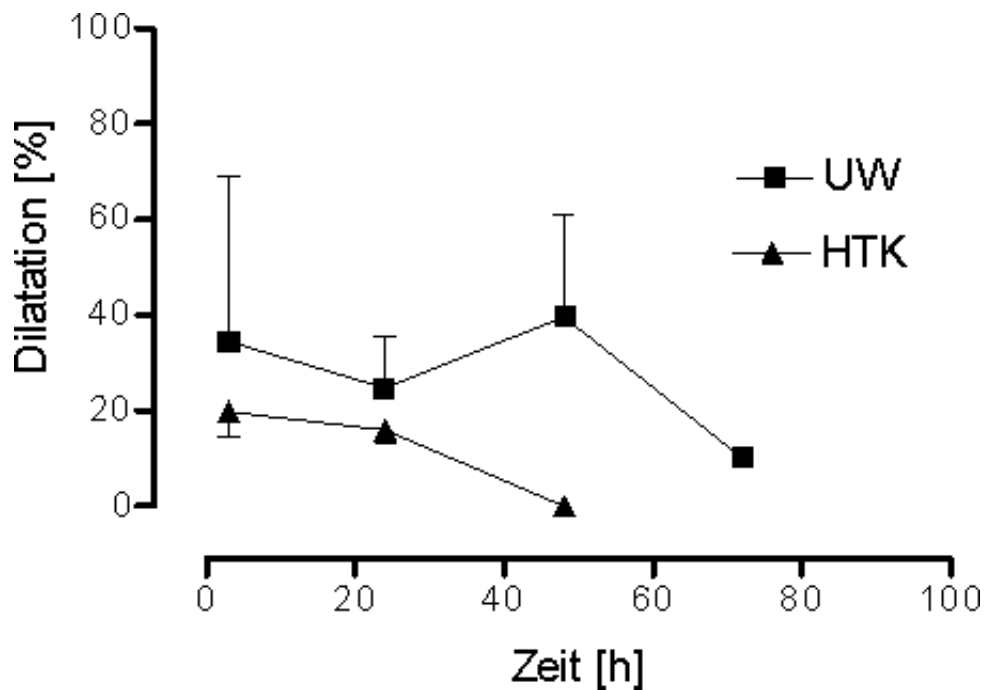


Abb.6: Die endothelabhängige Vasorelaxation der humanen Venensegmente, abhängig von der Konservierungszeit in UW- oder in HTK-Lösung. Dargestellt ist die durch $1\mu\text{M}$ Acetylcholin induzierte Vasodilatation in [%] nach einer Vorkontraktion mit $0.2\mu\text{M}$ Phenylephrin.

4.4 Morphologische Auswertung

Insgesamt 8 Venen wurden nach der funktionellen Messung des Vasotonus in den jeweiligen Zeitintervallen (3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) fixiert und morphologisch mittels Raster- Elektronenmikroskopie bei einer 625-fachen Vergrößerung ausgewertet. Davon waren 4 Venensegmente zuvor in der UW-Lösung konserviert und 4 Venen in der HTK-Lösung (Tab.10). Bei der morphologischen Auswertung sah man in beiden Lösungen bereits beim 3 h-Zeitpunkt teilweise kleine Endothelschäden, wovon in beiden Lösungen _ aller Venensegmente betroffen waren. So zeigen beide Venengruppen beim 3 h Zeitpunkt einen Score von 3.25 ± 0.25 , was einen prozentualen Endothelstatus von 81.3 % entsprach. Nach 24 h Konservierung konnte der Endothelzustand in beiden Lösungen (UW 3.25 ± 0.25 , HTK 3.25 ± 0.48) noch vollständig erhalten werden. Nach 48 h traten in beiden Lösungen größere Endothelschäden auf, die in der UW-Lösung mit einem Score von 2.75 ± 0.45 (68.8 %) etwas besser ausfielen, gegenüber 2.50 ± 0.50 (62.5 %) in der HTK-Lösung. Nach 72 h Konservierung kam es in beiden Lösungen zu einem Einbruch des Endothelstatus (UW 37.5 %, HTK 43.8 %). Am Ende der Konservierungszeit nach 96 h zeigten die UW-Venen einen Endothelzustand von 1.5 ± 0.5 Score (37.5 %) und die HTK-Venen einen Score von 1.25 ± 0.25 (31.3 %). Bei der statistischen Analyse mittels TWO-WAY-ANOVA gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungen ($p=0.6880$). In beiden Lösungen kam es im Laufe der Konservierungszeit zu signifikanten Endothelschäden ($P<0.0001$).

Morphologischer Endothelstatus

Tab.10: Morphologische Begutachtung der humanen Venensegmente mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie in den jeweiligen Lösungen nach bestimmten Konservierungszeiten [h]. Die Auswertung erfolgte mittels des Score-Verfahrens, wobei 4 Punkte einem vollständig erhaltenen; 3 Punkte großflächig erhaltenen, 2 Punkte vereinzelt vorhandenen und 1 Punkt fehlenden Endothel entsprach. Dargestellt sind die jeweiligen Scores mit die Standardabweichung und Anzahl der Venen [n]. Der Endothelverlust zeigte sich unabhängig von der Konservierungslösung ($p=0.688$), jedoch statistisch signifikant abhängig von der Konservierungszeit ($p<0.0001$).

Zeit [h]	HTK [Endothelstatus]	n	UW [Endothelstatus]	n
3	3.25 ± 0.25	4	3.25 ± 0.25	4
24	3.25 ± 0.48	4	3.25 ± 0.25	4
48	2.50 ± 0.50	4	2.75 ± 0.45	4
72	1.75 ± 0.25	4	1.50 ± 0.50	4
96	1.25 ± 0.25	4	1.50 ± 0.50	4

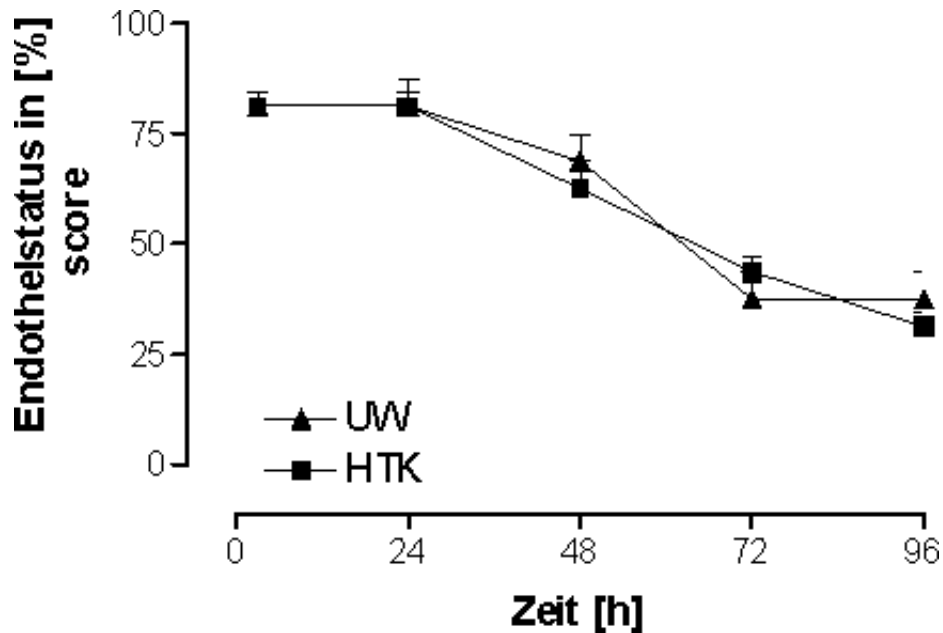
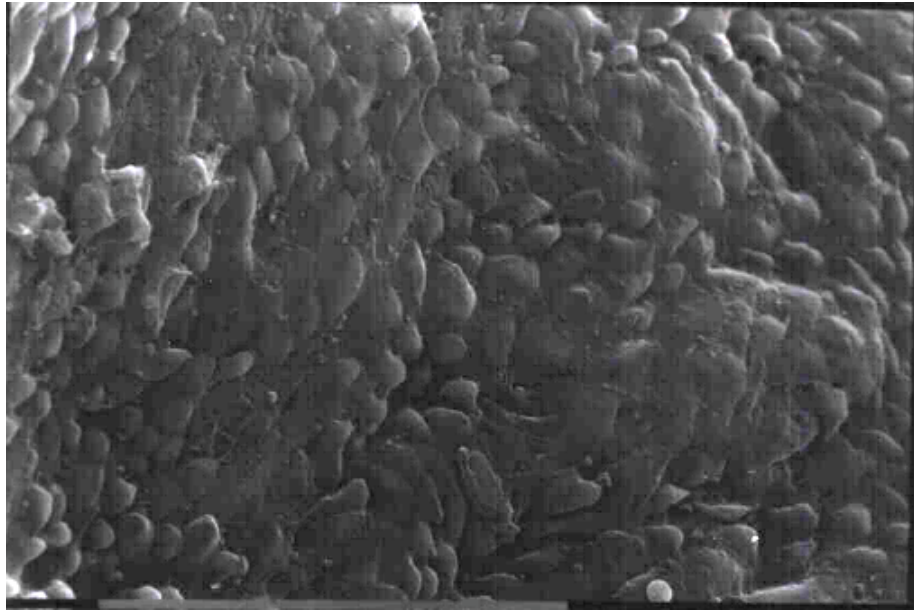


Abb.7: Morphologischer Endothelstatus der humanen Venensegmente. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen des Endothelstatus, ausgehend vom Score 4 (vollständig erhaltenes Endothel) im Laufe der Konservierungszeit in den jeweiligen Konservierungslösungen. Score 4 wurde als 100 % betrachtet.

A



B

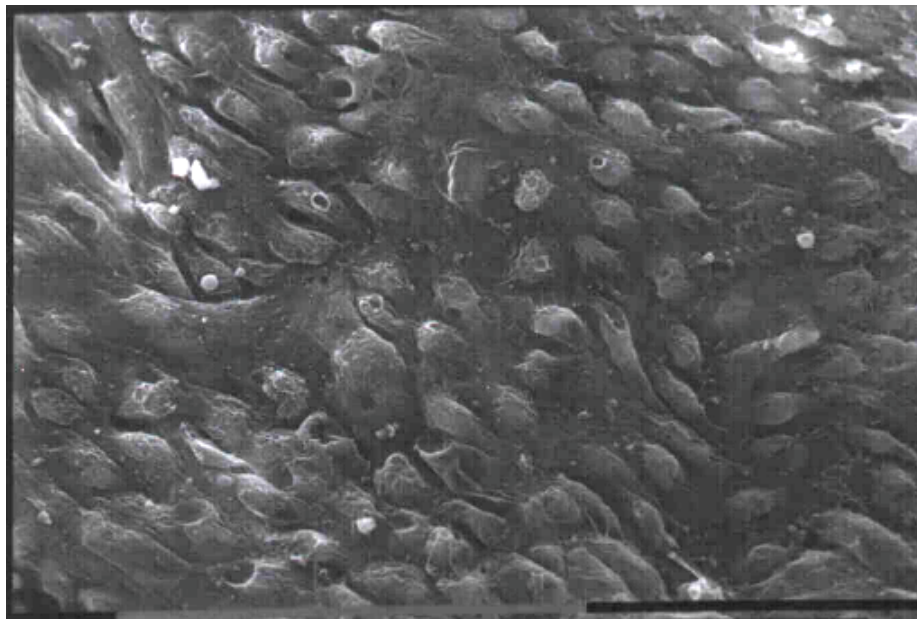
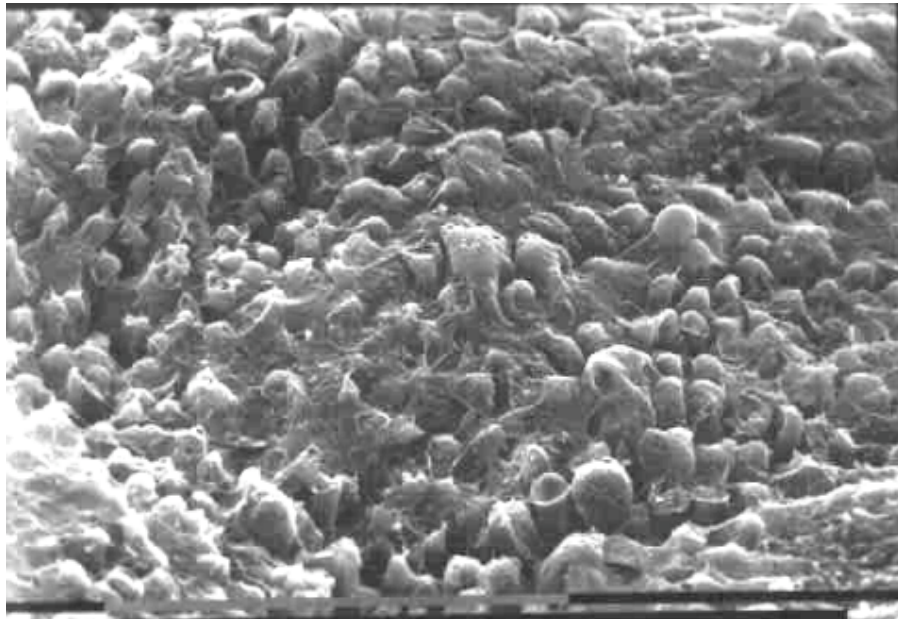


Bild 1 Raster- Elektronen- Mikroskopische Bilder mit einer 206-facher Vergrößerung (**A** HTK und **B** UW) nach 3 h initialer Konservierung mit positiver funktioneller Endothelreaktion. Dargestellt ist die Intima der Gefäßwand mit vollständig bis großflächig erhaltenem Endothel, welches 50-100 % (Score 4-3) des ursprünglichen Endothelstatus ausmacht (HTK 81 %, UW 81 %).

A



B

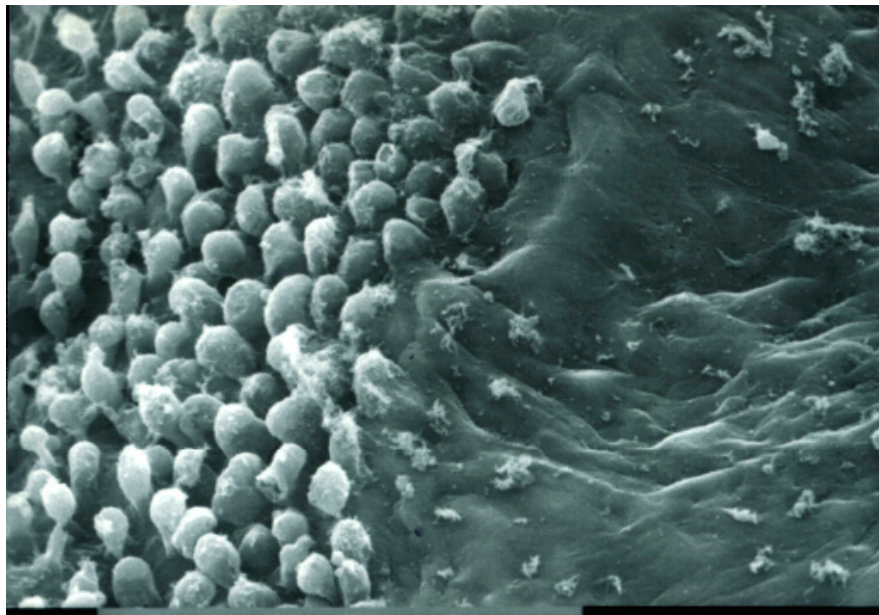
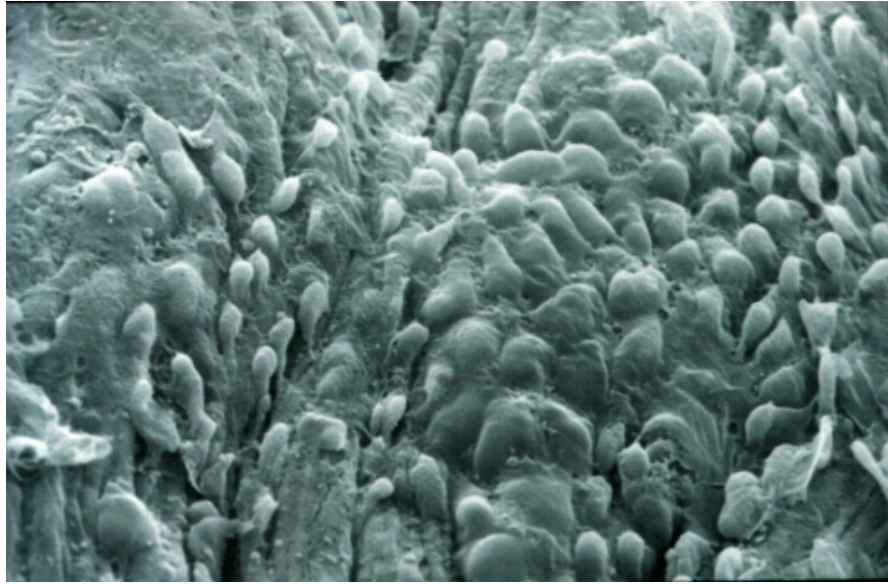


Bild 2 Raster- Elektronen- Mikroskopische Bilder mit einer 206-facher Vergrößerung (**A** HTK und **B** UW) nach 24 h initialer Konservierung mit positiver funktioneller Endothelreaktion. Dargestellt ist die Intima der Gefäßwand mit großflächig erhaltenem Endothel, welches 50-75 % (Score 3) des ursprünglichen Endothelstatus ausmacht (HTK 81 %, UW 81 %). Strangförmige Läsionen (Abb. **B** rechts) deuten auf traumatische Schäden (Pinzettengriff etc.) hin.

A



B

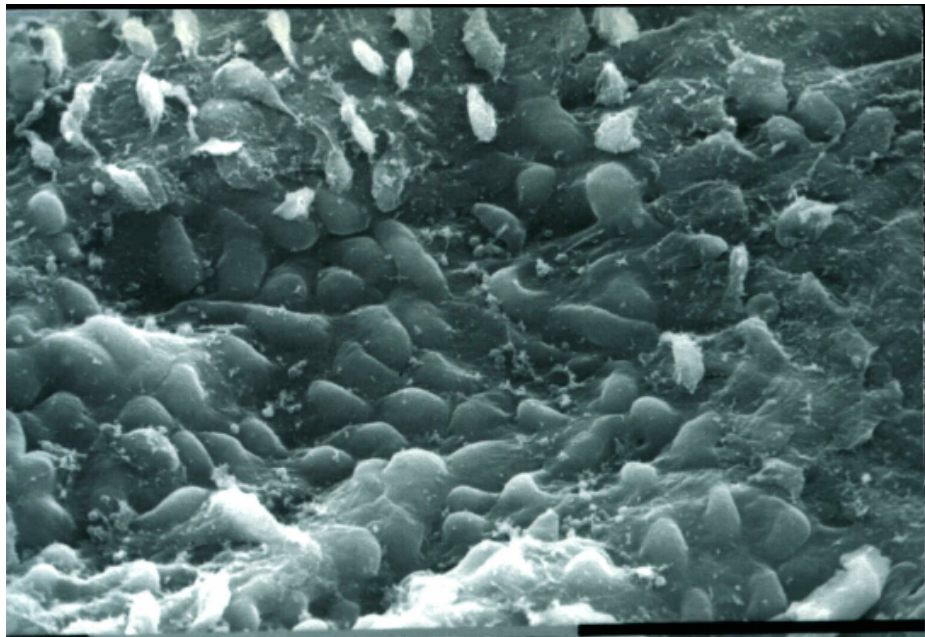
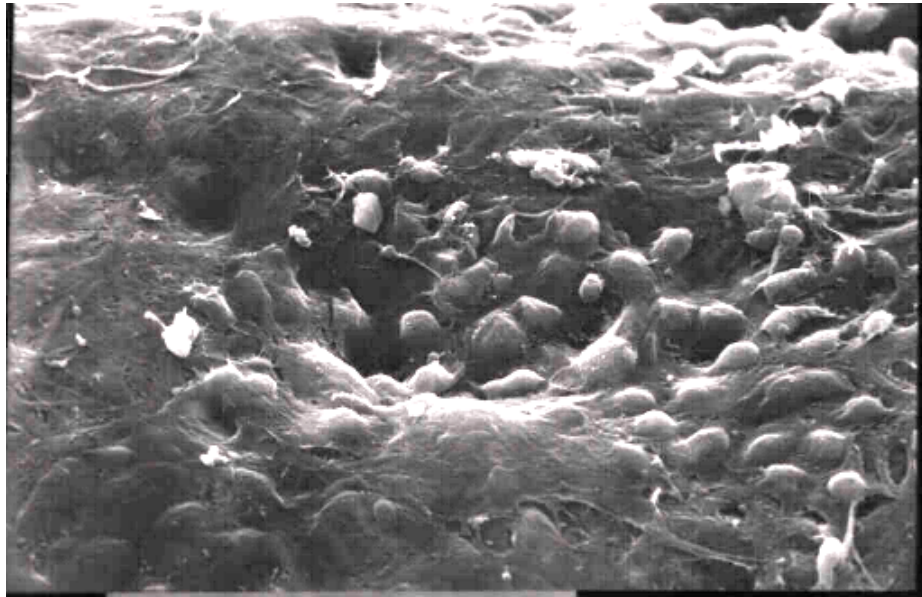


Bild 3 Raster- Elektronen- Mikroskopische Bilder mit einer 206-facher Vergrößerung (**A** HTK und **B** UW) nach 48 h initialer Konservierung mit positiver funktioneller Endothelreaktion. Dargestellt ist die Intima der Gefäßwand mit vereinzelt bis großflächig erhaltenem Endothel, welches 25-75 % (Score 2-3) des ursprünglichen Endothelstatus ausmacht (HTK 63 %, UW 69 %).

A



B

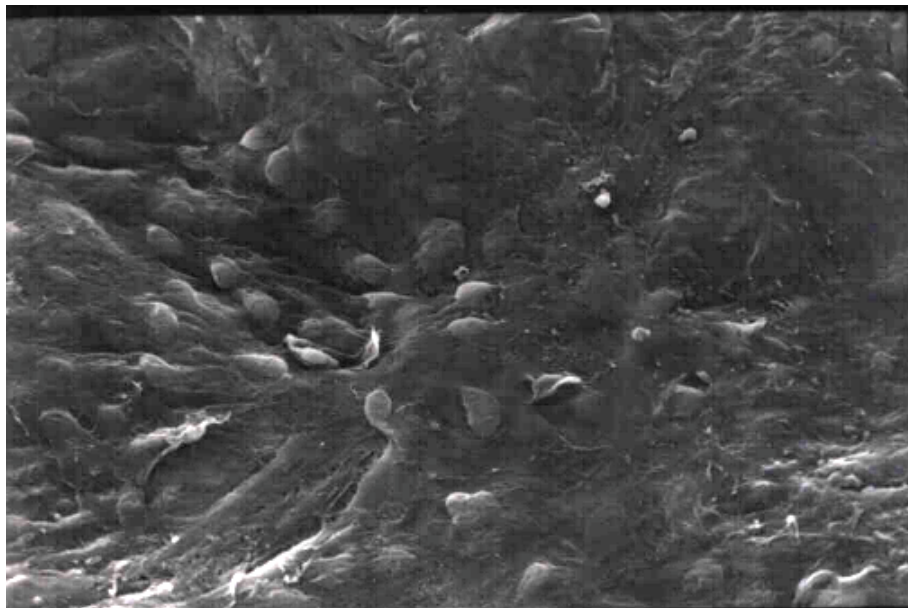
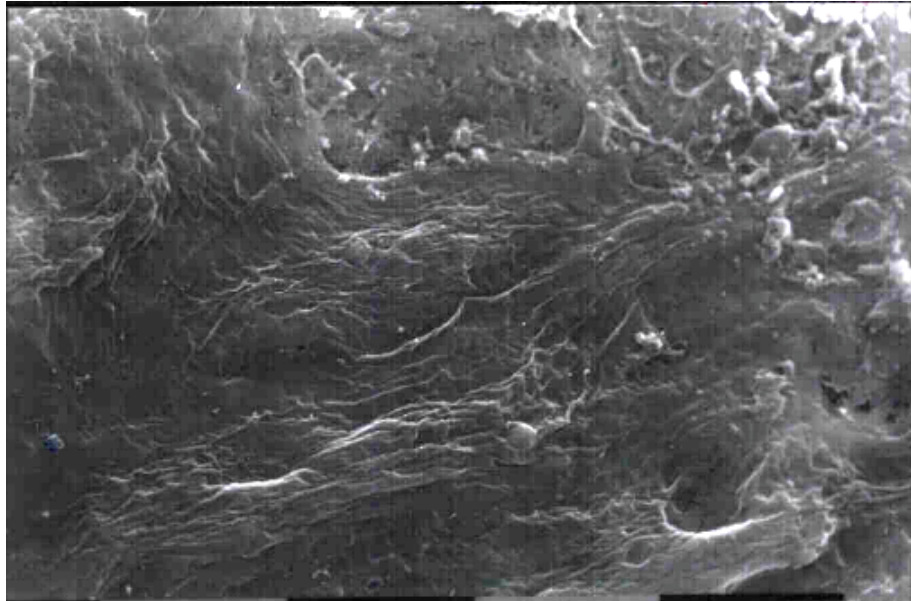


Bild 4 Raster- Elektronen- Mikroskopische Bilder mit einer 206-facher Vergrößerung (**A** HTK und **B** UW) nach 72 h initialer Konservierung mit positiver funktioneller Endothelreaktion. Dargestellt ist die Intima der Gefäßwand mit größtenteils zerstörtem Endothel, welches 25-50 % (Score 2) des ursprünglichen Endothelstatus ausmacht (HTK 44 %, UW 38 %).

A



B

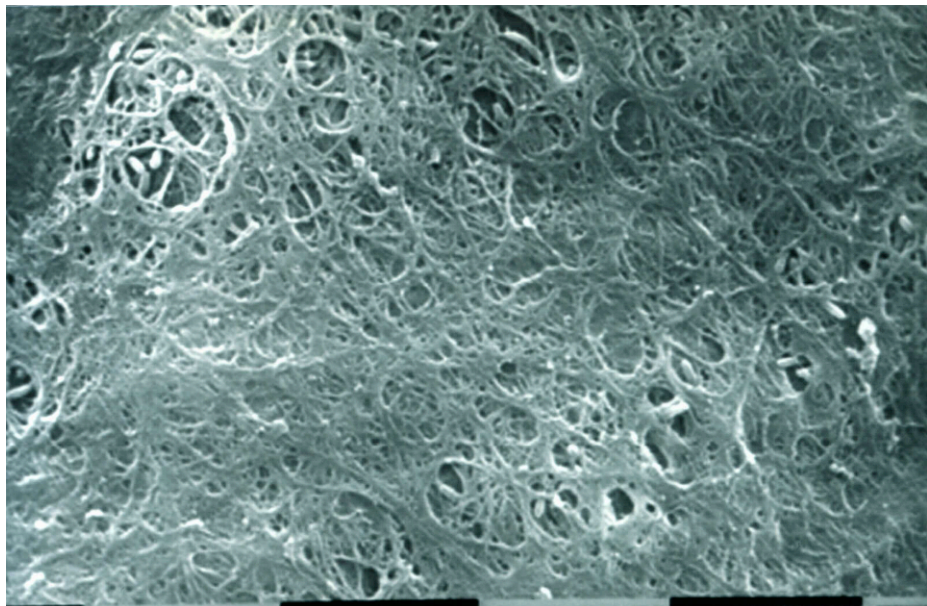


Bild 5 Raster- Elektronen- Mikroskopische Bilder mit einer 206-facher Vergrößerung (**A** HTK und **B** UW) nach 96 h initialer Konservierung mit positiver funktioneller Endothelreaktion. Dargestellt ist die Intima der Gefäßwand ohne Endothel, welches 0-25 % (Score 1) des ursprünglichen Endothelstatus ausmacht (HTK und UW Score 1).

5. Diskussion

Bei der Erhaltung der funktionellen Eigenschaften der Venensegmente spielten bei dieser vorliegenden Studie vor allem die Konservierungsmethoden und die Zusammensetzung der Konservierungslösungen, die nachfolgend diskutiert werden, eine zentrale Rolle. Nach Auswertung der experimentellen Ergebnisse weisen die Daten darauf hin, daß eine 48 h Konservierung von humanen Vena saphena magna Transplantaten in der UW-Lösung die endotheliale und glattmuskuläre Funktion besser erhält als die Konservierung in der HTK-Lösung. Bei der Vasokontraktion zeigte die UW-Lösung eine bessere Konservierung der α -Rezeptor abhängigen Eigenschaften als die HTK-Lösung. Dies wurde vor allem bei einer kleineren Phenylophrin-Konzentration (0.2 μ M) signifikant deutlich. Am empfindlichsten zeigte sich das Endothel bei der Konservierung der Venensegmente, dessen Vitalität mittels der Acetylcholin abhängigen Vasorelaxation überprüft wurde. Hier zeigte die UW-Lösung signifikant bessere Eigenschaften bei deren Konservierung. Hinsichtlich morphologischer Endothelveränderungen konnten zwischen den Lösungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nach unseren Ergebnissen sind ausschließlich auf morphologischer Ebene erzielte Beobachtungen für die Beurteilung einer Konservierungslösung unzureichend.

5.1 KONSERVIERUNGSMETHODEN

Ein bisher nicht erforschter Teilaspekt der allogenen Venentransplantation ist die geeignete Konservierung, welche die Voraussetzung einer optimalen Organtransplantation ist. Dabei spielt neben der Morphologie vor allem die Erhaltung der Vitalität und Funktionalität eine Rolle, weil davon ausgegangen werden muß, daß nur vitale Transplantate durch Diffusion vom Blutstrom ernährt werden können und nur diese eine rezipiente Integration erfahren. Geschädigte Gefäßtransplantate werden oft nur fibrotisch umgebaut und dienen lediglich als Blutleiter. Sie funktionieren dann zwar eine Weile noch als narbiger Schlauch, fallen dann

aber einer reparativen Okklusion zu Opfer. Bereits bei der Auswahl der Venen zum potentiellen Bypass, sollten möglichst gesunde Abschnitte entnommen werden, da bei varikösen Venen Intima- und Media verdickungen vorliegen können, die später zu raschen Gefäßveränderungen führen können {Kirsch 1999}.

Die hohe Zahl solcher Frühverschlüsse konnte auch durch die in der Vergangenheit favorisierte Kryokonservierung nicht verhindert werden {Castier 1999, Brockband 1994, Davies 1999}. Wesentliche Ursache scheint die mit dieser Art von Konservierung ausgelöste Abtötung aller zellulären Bestandteile des Transplantats zu sein, was durch Ablösung der Intima und fibrotische Wanddegeneration sichtbar wird {Boeken 1993, Bujan 2000}. So konnte Deterling {1951} bei kryokonservierten Venentransplantaten in Gewebekulturen kein Wachstum nachweisen, was den konservierten Zelltod belegt. Davies {1999} und Harris {1993} beobachteten unabhängig voneinander bei kryokonservierten Venen Intimahyperplasien, die Frühokklusionen erklären könnten.

Das Ziel künftiger allogener Venentransplantationen ist die Verwendung frischer Gewebe. In der Regel handelt es sich um Gefäße hirntoter Spender. Mehrere Autoren zeigten in der Vergangenheit, daß zwischen autologen und allogenen Venentransplantaten bei effizienter Immunisierung keine signifikanten Unterschiede vorliegen {McGeachie 1983, Tice 1970/1972, Ochsner 1984}. Da aus Gründen des organisatorischen Operationsablaufes und des immunologischen Monitorings (Cross match) dennoch einige Stunden bis zur Gefäßimplantation vergehen, spielt die Konservierung und Preservation des Transplantats eine wichtige Rolle. Frühere Studien von Langhammer {1987} und Ruth {1992} konnten an isolierten Venensegmenten nachweisen, daß außer heparinisiertem autologen Blut nur Konservierungslösungen mit niedrigem Gehalt an Natriumionen (Intrinsic-Lösungen) einen befriedigenden Erhaltungsstand des Transplantats gewährleisten. Zu diesen Lösungen gehören neben der HTK-Lösung (Bretschneider) auch die heute ubiquitär verwandte UW- Lösung.

Mit der UW-Lösung als Konservierungsmedium beschäftigten sich ebenfalls Southard und Belzer {1995}. Sie konnten Leber, Pankreas und Nieren erfolgreich bis zu 2 Tagen in der UW-Lösung bei 0-5°C konservieren. Die Effizienz der UW-Lösung sahen sie in dessen Zusammensetzung, weil hier eine Reihe von zellinternen Substanzen (Laktobionsäure, Raffinose, Hydroxyethylstärke) enthalten sind, welche die Zellschwellung bei der kalt-ischämischen Konservierung vermindern. Hinzu berücksichtigten sie die Bedeutung des Glutathions und Adenosins, ebenfalls Komponenten der UW-Lösung, die durch Steigerung der antioxidativen Kapazitäten und Forcierung der ATP-Regeneration den zelleigenen Metabolismus fördern.

Santoli {1994} und Anastasiou {1997} konnten bestätigen, daß andere Medien wie z.B. heparinisierte NaCl-Lösung nach einigen Stunden durch Auslösen einer Azidose die Denaturierung zellulärer Proteine mit terminaler Koagulationsnekrose des Endothels hervorrufen. Die Folgen sind die Einwanderung von Entzündungszellen in die Gefäßintima sowie die Ablagerung von Fibrin und Thrombozyten auf endothelfreie Wandstellen. Später kommt es in diesen Regionen zur narbigen Wandverdickung mit Einengung des Lumens.

Die UW-Lösung scheint nach unseren Ergebnissen in den ersten 48 Stunden den kontraktilem Apparat besser zu konservieren als die HTK-Lösung. Sowohl die rezeptorabhängige Kontraktion durch Phenylephrin als auch die rezeptorunabhängige Kontraktion mittels KCl zeigen bessere Konservierungsergebnisse in der UW-Lösung, wobei die Unterschiede zwischen den Lösungen bei der Phenylephrin-induzierten Vasokontraktion deutlich und bei der KCl-induzierten Vasokontraktion eher gering ausfallen.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte auch Cavallari {1995/1997} in seinen Studien die bessere Erhaltung der kontraktilem Funktionen in der UW-Lösung beobachten. Im Gegensatz zur NaCl-Lösung und zum autologen Blut gab es in der UW-Lösung keinen signifikanten Verlust der Kontraktilität nach 24 Stunden Konservierung. Vischjäger konnte 1997 in seinen Versuchen mit Hunde- und Rattenarterien nach 14 Tagen Konservierung in der UW-Lösung noch bis zu 60 % der ursprünglichen Kontraktionskraft nachweisen. Die günstige

Konservierbarkeit des glattmuskulären kontraktilem Apparates in der UW-Lösung wird auch in den Studien von Santoli {1993/1994} und Mingoli {1995/1997} bestätigt.

Im Gegensatz zur UW-Lösung gab es in der Vergangenheit kaum Konservierungsversuche von Venentransplantaten mit der HTK-Lösung. Grohs testete 1996 an humanen Saphena magna-Venen die HTK-Lösung, autologes Blut und 5 %ige Albuminlösung bezüglich der Erhaltung der Kontraktilität. Nach 36 h Konservierung zeigten die Venen in der Albuminlösung keinerlei Kontraktionen, dagegen im autologen Blut noch 24 % KCl-induzierte und 16% Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion. Bei den HTK-konservierten Venen beobachtete Grohs nach 36 h noch eine maximal 82 %ige Kontraktion nach KCl-Gabe, wobei die Noradrenalin (0.2 und 2 μ M) induzierte Vasokonstriktion noch voll erhalten blieb. Nach 96 h zeigten die Venen in allen Konservierungsmedien nur noch schwache Kontraktionen, so daß Grohs zwischen den Lösungen keine relevanten Unterschiede mehr sah. Er postulierte, daß die HTK-Lösung unter den Lösungen, die er testete, am geeignetesten für eine Konservierung der Venen bis zu 36 h wäre.

Unsere Ergebnisse für die HTK-Lösung ähneln in Bezug auf die KCl-induzierte Vasokonstriktion weitestgehend Grohs Beobachtungen. Wir sahen bei den HTK-Venen nach 24 h Konservierung 89 % und nach 48 Stunden 60 % der KCl-induzierten Kontraktionskraft (siehe Abb. 1). In der UW-Lösung erzielten wir jedoch mit 88 % Kontraktionsvermögen nach 24 Stunden und 72 % nach 48 h bessere Werte als bei HTK in der eigenen Versuchsreihe. In Bezug auf die α_1 -adrenerge Vasokonstriktion können wir jedoch Grohs Ergebnisse nicht bestätigen. Wir sahen in der HTK-Gruppe bei 0.2 und 2 μ M Phenylephrin bereits nach 24 h deutliche Einbußen der Kontraktilität (siehe Abb. 3 und 4).

5.2 Konservierungsbedingungen / Konservierungslösungszusammensetzung

Die Venensegmente wurden alle unter hypothermen Bedingungen bei 4°C unter Lichtausschluß aufbewahrt. Ziel dabei war es, die metabolischen Stoffwechselvorgänge in den

Venentransplantaten zu reduzieren. Die meisten Organe tolerieren eine warme Ischämie für 30 – 60 min ohne einen kompletten Funktionsverlust. Während einer hypothermen Lagerung kann eine Preservation um den Faktor 12 – 13 verlängert werden {Belzer, Southard 1988}. Bei Zimmertemperatur (ca. 21°C) finden in und zwischen den Zellen der explantierten Venensegmente rege Stoffwechselfvorgänge statt. Extrazellulär liegt eine hohe Natriumionen-Konzentration vor; intrazellulär dagegen eine hohe Kaliumionen-Konzentration, so das ein ständiger Einstrom von Natriumionen und ein Austrom von Kaliumionen vorliegt. Die einströmenden Natriumionen ziehen dabei immer jeweils ein Chloridion mit hinein, was gleichzeitig aus osmotischen Gründen zu einem Eindringen von Wassermolekülen in die Zelle führt. Hinzu kommt, daß die extrazelluläre Kalziumionen-Konzentration höher ist als die intrazelluläre, so daß schließlich auch ein Einstrom von Kalziumionen erfolgt.

Schließlich kommt es im Rahmen des Donnan-Effektes (Proteinanionen können durch die Zellmembran nicht durch, so daß ein Konzentrationsungleichgewicht vorliegt) zu einem Anstieg des intrazellulären onkotischen Druckes, was zusätzlich zu einem weiteren Einstrom von Wassermolekülen führt (hydrostatischer Druck wirkt dem Konzentrationsungleichgewicht entgegen).

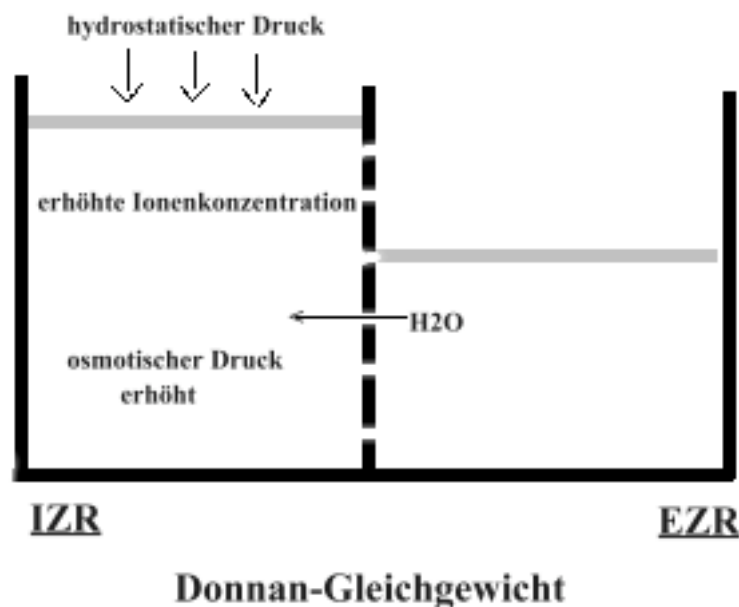


Abb. 9: Dargestellt ist schematisch das Donnan-Gleichgewicht. Größere Proteinanionen können die Zellmembran nicht penetrieren, so daß ein Konzentrationsungleichgewicht entsteht. Aufgrund des onkotischen Druckes strömt Wasser aus dem Extrazellulärraum (EZR) in die Zelle (IZR), wobei der hydrostatische Druck entgegen wirkt.

Unter normalen, gut oxygenisierten Umständen, produzieren die Mitochondrien energiereiche Adenosintriphosphatbindungen (ATP), welche die Elektrolyt-Pumpen der Zellmembran in Gang halten und so eine Balance der Ionenkonzentrationen gewährleisten. Die Natrium-Kalium aktivierte ATPase pumpt jeweils 3 Natriumionen aus der Zelle raus und 2 Kaliumionen hinein. Damit bildet sich ein Membranpotential, welches innen negativ und außen positiv ist. Wichtig hierbei bleibt zu bemerken, daß dieses Membranpotential die einzige Barriere ist, um die negativ geladenen Chloridionen extrazellulär zu halten. Darüber hinaus befördert die Natrium-Kalzium abhängige ATPase jeweils einen Kalziumion aus der Zelle hinaus und dafür einen Natriumion hinein, was dann auch zu einer Unterstützung des Membranpotentials führt. Unter hypoxischen (ischämischen) Bedingungen, die bei einer Explantation der Venensegmente praktisch hervorgerufen werden, kommt es zu einer drastischen Einschränkung des ATP, welches im Mitochondrium sauerstoff-abhängig produziert wird. Die Folge ist eine Einstellung der Membranpumpen, so daß Natriumionen und Chloridionen zunehmendes in die Zelle eindringen, und einen Einstrom von Wassermolekülen nach sich ziehen. Da das Membranpotential abnimmt bricht die Barriere gegen Chloridionen zusammen, so daß diese ungehindert in die Zelle eindringen und dabei Natriumionen und Wassermoleküle mit sich ziehen. Dabei strömt für jedes eindringende Natriumion ein Kaliumion nach außen. Ferner kommt es zu einem unbehinderten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle und zu einer Entleerung der intrazellulären, spannungsabhängigen Kalziumspeicher (endoplasmatisches Retikulum). Einige Autoren glauben, daß dieser zellulärer Kalziumionen-Anstieg der schädlichster Effekt der Hypoxie wäre und zum Zelltod führen würde {Hochachka 1986}.

Bei Hypothermie sind alle metabolischen Stoffwechselfvorgänge reduziert, so ist die Natriumionen-abhängige ATPase zwar reduziert, bleibt aber dennoch aktiv {Martin et al. 1972}. Da die Aktivität der Membranpumpen auch bei Hypothermie allmählich reduziert wird, kommt es im weiteren Verlauf ebenfalls zu einer Abnahme des Membranpotentials. Auch hier ist

dann die Folge die Diffusion von Chloridionen und Wassermolekülen ins Zellinnere {MacKnight 1977, Martin 1972}.

Nach Darstellung der Physiologie der Zellfunktion unter normalen, ischämischen und hypothermen Bedingungen kann man die Zusammensetzung der Konservierungslösungen verstehen und sie eingehender diskutieren. Schlußfolgernd aus dieser Darstellung der Stoffwechselfvorgänge wurden unsere Venentransplantate unter hypothermen Bedingungen bei 4°C unter Lichtausschluß aufbewahrt. Die Vorzüge einer hypothermen Lagerung von Organen wurden in der Vergangenheit von mehreren Autoren beschrieben {Collins 1969, Belzer 1967}. Ein wichtiger Punkt für eine erfolgreiche Konservierung unter hypothermen Bedingungen ist die Vermeidung einer intrazellulären Azidose {Langhammer 1987}. Der Kohlenhydratverbrauch ist unter anaeroben Bedingungen siebenmal höher als unter aeroben Bedingungen. Ischämie stimuliert auch bei Hypothermie die Glykolyse und Glykogenolyse (Pasteur-Effekt → beruht auf der Hemmung der Phosphofruktokinase durch Citrat und ATP). Es kommt zu einer erhöhten Milchsäure-Produktion und zu einer Zunahme der Hydroxoniumionen (H^+). Diese Gewebsazidose kann eine Zellschädigung hervorrufen und durch Aktivierung von lysosomalen Enzymen eine organelle Instabilität induzieren, die auch Mitochondrien betrifft.

Die Zusammensetzung der UW-Lösung ist nach Notwendigkeit und Bedarf den metabolischen Vorgängen während einer hypothermen Preservation angepaßt {Belzer 1988}. Um bei einer hypothermen Lagerung das permanente Diffundieren von Chloridionen zu vermeiden, entschied man sich Chloridionen gänzlich weg zu lassen und dafür großmolekulare, nicht membrangängige Laktobionate einzusetzen (Tab.1). Ebenfalls zur Vermeidung einer Zellschwellung ist der Anteil an Natriumionen minimal (Na-Gehalt: 30 ± 5 mM). Außer im Rahmen einer Pufferung mit Natronlauge (NaOH) wurden keine weiteren Natriumionen hinzugefügt. Da es während der Preservation zu einem Eindringen der extrazellulären Kalziumionen ins Cytosol und zusätzlich zu einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher kommt,

was dann zu einer zytotoxisch hohen Kalziumkonzentration führt {Hochachka 1986}, enthält die UW-Lösung keine Kalziumionen.

Bezüglich der Kaliumionen wurde um die intrazelluläre Kaliumkonzentration zu erhalten, in der UW-Lösung die extrazelluläre Kalium-Konzentration auf 25 mmol erhöht, was dann auch bei einer reduzierten Pumpaktivität der Natrium-Kalium ATPase die intrazelluläre Kalium-Konzentration aufrecht erhält. Da vergangene Studien zeigten, daß durch Zugabe von Adenosin eine höhere ATP-Konzentration über bis zu 5 Tagen erhalten werden kann, wurde dem entsprechend der UW-Lösung Adenosin zugefügt {Belzer 1986}. Adenosin ist membrangängig und stimuliert intrazellulär die ATP-Synthese {Southard 1985, D'Alessandro 1987}. Aufgrund der Eigenschaft von Glukose bei ihrer Verstoffwechslung Milchsäure und Hydroxoniumionen (H^+) freizusetzen, wurde sie gänzlich weggelassen. Zudem enthält die UW-Lösung mehrere Phosphationen, die zur Pufferung von Hydroxoniumionen dienen. Raffinose, ebenfalls ein großmolekulares nicht membrangängiges Molekül wurde zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts eingesetzt. Als reduzierendes Antioxidans wurde der Lösung Gluthation beigefügt, welches bekanntlich auch physiologisch als Bestandteil von Zellmembranen jegliche Oxidantien (freie Radikale, Lipidperoxidasen, Wasserstoffperoxide, etc.) reduziert {Freeman 1982, Ziemlanki 1982}. Als weiterer membranstabilisierender Faktor enthält die Lösung Steroide (Dexamethason), dessen Effizienz sich bereits in zahlreichen Studien erwiesen hat {Guldutuna 1993, Lugovoj 1980, Goldfarb 1983}. Jarvelainen konnte ebenfalls einen stabilisierenden Effekt von Steroiden (Dexamethason) bei Zellkulturen mit humanen Endothelzellen feststellen {Jarvelainen 1985}. Allopurinol hemmt die Xanthinoxidase und damit die Bildung von freien Radikalen {Green 1989}. Einige Autoren bezweifeln jedoch die Rolle des Allopurinols, bezüglich der Inhibition der Bildung von freien Radikalen, da sie keinen Einfluß auf die Konzentration von Antioxidantien wie Glutathion zeigten {Karwinski 1993}. Hydroxyethylstärke (HES) wurde als nicht toxisches Kolloid zur Vermeidung der Ausdehnung des Extrazellulärraumes eingesetzt {Hoffmann 1983}. Penizillin dient zur Ver-

meidung vom bakteriellen Befall des Transplantates während der Konservierung. Das Insulin zeigte während der Konservierung in vergangenen Studien einen protektiven Effekt auf die Zellvitalität, so das es ebenfalls Bestandteil der UW-Lösung ist {Shimada 1995, 1996}.

Wesentliche Unterschiede gegenüber der UW-Lösung bestehen in der Zusammensetzung der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat Lösung (HTK). So sind in der HTK mit 15 mmol halb soviel Natriumionen enthalten wie in der UW-Lösung (Tab.2). Allerdings ist der Anteil der Kaliumionen mit 10 mmol extrem niedrig, verglichen zu 125 mmol in der UW. Außerdem enthält die HTK-Lösung Chloridionen (ca. 32 mmol). Eine protektive Rolle wird dem Histidin-Anteil in der HTK zugeordnet, so wird deren Puffer-Fähigkeit durch zahlreiche Studien bestätigt {Beauvieux 1993, Sumimoto 1991}. Die Aminosäure Histidin scheint durch Stimulierung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels den pH-Wert zu erhöhen. Speziell durch Pufferung der Metabolite einer anaeroben Glykolyse, erhöht Histidin die Aktivität der Phosphorylase-Enzyme und erreicht damit eine hohe ATP-Konzentration {Churchill 1998, Takeuchi 1995}. Einige Autoren beobachteten bei Histidin-versetzten Lösungen eine höhere ATP-Konzentration in Transplantaten (Leber-Transplantate) als in der UW-Lösung {Mitchell 1996}. Neuere Studien zeigten zudem, daß Histidin bei der Hemmung intrazellulärer Proteasen mitwirkt und so die Konzentration von Antioxidantien wie Glutathion auf höherem Niveau hält {Upadhyya 2000}. Ein antioxidativer und damit membranstabilisierender Effekt des Mannitols, ebenfalls Bestandteil der HTK-Lösung, wird durch zahlreiche Autoren bestätigt {Wickens 1987, Mazor 1990}. Mannitol reduziert freie Radikale, welche die Zellmembran angreifen und schützt so die Zelle vor Zellschwellung {Dunphy 1999}. Als weiteren wesentlichen Bestandteil enthält die HTK-Lösung die Aminosäure Tryptophan (Tab.2). Tryptophan, welches physiologisch ein Baustein der Zellmembranen ist, besitzt amphophile und dipolare Eigenschaften, die es ermöglichen, als wichtiges Glied zwischen hydrophilen und hydrophoben Membranschichten zu agieren {Wallace 1999}. So tritt Tryptophan vorzugsweise an Membranschnittstellen auf und erfüllt damit eine wichtige Funktion bei der Membranstabili-

sierung {Yau 1998, Slobozhanina 1991}. Weitere Studien zeigten, daß Tryptophan eine zentrale Funktion bei der Erhaltung spezieller Zellkanäle besitzt {Lasalde 1996}.

5.3. Rezeptor-unabhängige Vasokontraktion

Die Anreicherung der Kaliumkonzentration in der Organbadlösung auf 80 mM/l führte bei der initialen Messung (3 h nach Explantation) zu einer Spannungsentwicklung von 59.90 ± 12.08 mN bei den Venen der UW-Gruppe, bzw. von ca. 38.1 ± 5.7 mN bei den HTK-Venen (siehe Tab.4). Die hier gemessenen Werte beruhen auf einer Abnahme des Gefäßsegmentdurchmessers infolge der Vasokonstriktion. Diese wiederum ist auf die Kontraktion glatter Muskelzellen in der Tunica media der Gefäßwand zurückzuführen. Voraussetzung für diese Kontraktion ist eine Erhöhung des Kalzium-Gehaltes in der glatten Muskelzelle {Bolton 1979}. Diese Kalziumanreicherung resultiert aus dem Einstrom extrazellulärer Ionen, sowie in geringem Maße, aus der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Freisetzung wird durch second-messenger wie dem Inositoltriphosphat vermittelt {Somlyo und Himpens 1989}. Der Einstrom von Kalzium erfolgt durch Kanäle, deren Durchgängigkeit über die Änderung des Membranpotentials (spannungsabhängige Kanäle) oder aber über die Wirkung von vasoaktiven Substanzen auf Rezeptoren der Zellmembran (Rezeptor gesteuerte Kanäle) geregelt wird.

Bei den spannungsabhängigen Kanälen führt eine starke Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einem Einstrom der Kaliumionen ins Innere der glatten Muskelzelle.

Dies bewirkt eine Abnahme des an an der Zellmembran bestehenden elektrischen Potentials, eine Depolarisation. Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle reagieren auf diese Änderung des Membranpotentials mit einer Erhöhung ihrer Permeabilität, so daß extrazelluläres Kalzium ins Cytosol strömt {Bolton 1979}. Das eingeströmte bzw. freigesetzte Kalzium führt unter ATP-Verbrauch zu einer Phosphorylierung der Myosinköpfechen, welche daraufhin mit Aktin Brückenverbindungen eingehen, die sich als Kontraktion der glatten Muskelzelle äußern.

Bei unseren Versuchen konnten wir bezüglich der rezeptorunabhängigen Vasokontraktion mittels KCl im Laufe der Konservierungszeit keine signifikanten Unterschiede ($p=0.08$) zwischen den beiden Untersuchungslösungen feststellen. In beiden Konservierungsmedien nahm die Vasokontraktion während der Konservierungszeit nahezu kontinuierlich ab. In den ersten 24 h zeigten die UW-Venen 88 % Vasokontraktionen, vergleichbar hohe Vasokontraktionen konnten die HTK-Venen mit 89 % aufweisen. Nach 48 h Konservierung änderte sich das Verhältnis deutlich zu Gunsten der UW-Venen mit 72 % versus 60 % bei den HTK-Venen (Abb.1). Offenbar scheinen die glattmuskulären Zellen der Venen in beiden Lösungen hohe Einbußen aufzuweisen, wobei in der UW-Lösung nach 48 h eine deutlich günstigere Konservierung der glattmuskulären rezeptorunabhängigen Eigenschaften vorliegt.

5.4. Rezeptor-abhängige Vasokontraktion

Die Spannungsentwicklung nach der kumulativen Gabe von 0.2; 2 und 20 μM Phenylephrin kommt ebenfalls durch Vasokonstriktion zustande, die jedoch über andere Mechanismen verläuft als die Kalium bedingte Vasokonstriktion. Hier wirkt Phenylephrin über eine Aktivierung der adrenergen Rezeptoren (α_1 - und α_2 -Rezeptoren) an der Membran der glatten Muskelzellen. Phenylephrin führt über die α_1 -Rezeptoren zur Aktivierung des G-Proteins und der Phospholipase C, die ebenfalls membranständig sind {Kojda 1997}. Die Phospholipase C katalysiert die Bildung des second-messengers Inositoltriphosphat, welcher seinerseits die Entleerung der Kalziumspeicher des sarkoplasmatischen Retikulums ins Cytosol bewirkt. Das Phenylephrin vermag bei hoher Dosierung auch über Aktivierung von α_2 -Rezeptoren die Permeabilität der Kalziumkanäle der Muskelzellwand zu erhöhen und damit den Einstrom von extrazellulären Kalziumionen zu fördern. Der zytoplasmatische Kalziumionen Anstieg führt auch hier unter ATP-Verbrauch zur Phosphorylierung der Myosinköpfechen und zur Bildung von Brückenverbindungen mit Aktin, die zur Kontraktion der glatten Muskelzelle führt.

In unseren Versuchen konnten wir bei 0.2 μM über 48 h eine signifikant ($P < 0.05$) bessere Konservierung der α_1 -Rezeptor abhängigen Vasokontraktion in der UW-Lösung nachweisen, als in der HTK-Lösung (Abbildung 2). Verglichen mit den HTK-konservierten Venen scheinen die UW-konservierten Venen demnach hinsichtlich des rezeptorabhängigen Kontraktionsapparates besser erhalten zu sein. Während die Venen in UW-Lösung nach 24 h bei 0.2 μM PE praktisch keinerlei Funktionsverlust zeigten (97 %) und bei 48 h noch 66 % der Vasokontraktion aufwiesen, betrug die Vasokontraktion der Venen in HTK-Lösung nach 24 h lediglich noch 63 % und nach 48 h nur noch 58 %. Ähnliche Werte lagen bei 2 μM Phenylephrin vor. Nach 24 h zeigten die UW-Venen (82 %) bedeutsam bessere Vasokontraktionen als die HTK-Venen (75 %). Die UW-Venen zeigten auch über die weitere Konservierungszeit (48 h, 72 h und 96 h) gegenüber den HTK-Venen eine 5-10 % stärkere Vasokontraktion (Abb 3). Bei der maximalen α_1 -induzierten Vasokontraktion mit 20 μM Phenylephrin gab es zwischen den beiden Konservierungslösungen keinerlei signifikante oder bedeutsame Unterschiede (Abb.4). In den ersten 24 h überwogen hier die HTK-Venen (86 %) gegenüber den UW-Venen (81 %), wobei nach 48 h die UW-Venen (65 %) bessere Vasokontraktionen zeigten als die HTK-Venen (54 %). Bei dieser maximalen Vasokontraktion durch 20 μM Phenylephrin kommt es wahrscheinlich zu einer Aktivierung von α_2 -Rezeptoren, welche die Permeabilität der membranständigen Kalziumkanäle der Muskelzellen erhöhen und damit den Einstrom von extrazellulären Kalziumionen zu fördern.

Neue Erkenntnisse brachte die Tatsache, daß die rezeptorunabhängige Kontraktionseigenschaft der Gefäße in beiden Lösungen besser konserviert wurde als die rezeptorvermittelte Kontraktion. So konnten wir feststellen, daß die KCl- induzierte Vasokonstriktion in der UW nach 24 h 88 % und nach 48 h 72 %, sowie in der HTK nach 24 h 89 % und nach 48 h 60 % des Ausgangswertes betrug. Demgegenüber sank die PE (20 μM)-induzierte Kontraktionskraft in der UW nach 24 h auf 81 %, nach 48 h gar auf 65 %, sowie in der HTK nach 24 h 86 % und nach 48 h auf 54 %. Demnach müssen während der Konservierung Schäden entstanden

sein, die auch die Signaltransduktion zwischen den glatten Muskelzellen beeinträchtigen, da der Effekt des adrenergen PE's über α_1 -Rezeptoren und GAP-Verbindungen verläuft. Bei 0.2 und 2 μ M PE ist der Verlust der Kontraktionskraft in beiden Lösungen verglichen mit der KCl sogar noch gravierender (siehe Abb.1, 2 und 3). Diese Ergebnisse zeigen, daß die α_1 -Rezeptoren sehr ischämie-sensibel sind.

5.5. Dilatative Eigenschaften der Gefäßsegmente

Das zu Anfang jedes Versuchs nach Vorkontraktion der Gefäße applizierte Acetylcholin führte an den Segmenten der humanen Vena saphena nur zu schwachen und kurz andauernden Relaxationen. Diese wurde als vorübergehende Spannungsabnahme infolge einer kurzen Vergrößerung des Gefäßdurchmessers vom Spannungsaufnehmer gemessen und ist auf eine transiente Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen zurückzuführen.

Furchgott konnte bereits 1980 als Voraussetzung für die Wirksamkeit verschiedener Vasodilatoren ein intaktes Endothel identifizieren {Furchgott 1980}. Er konnte nachweisen, daß ACH endothelabhängig wirkt und daß ACH in den Endothelzellen zur Freisetzung einer bis dahin unbekannt Substanz führt, welche für die Dilatation der glatten Muskelzellen verantwortlich sei. Furchgott postulierte 1981 die rezeptorvermittelte Freisetzung einer endothelialen relaxierenden Substanz, das Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) {Furchgott 1981}. Später wurde erkannt, daß dieses EDRF dem Stickstoffoxid (NO) entspricht {Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987}.

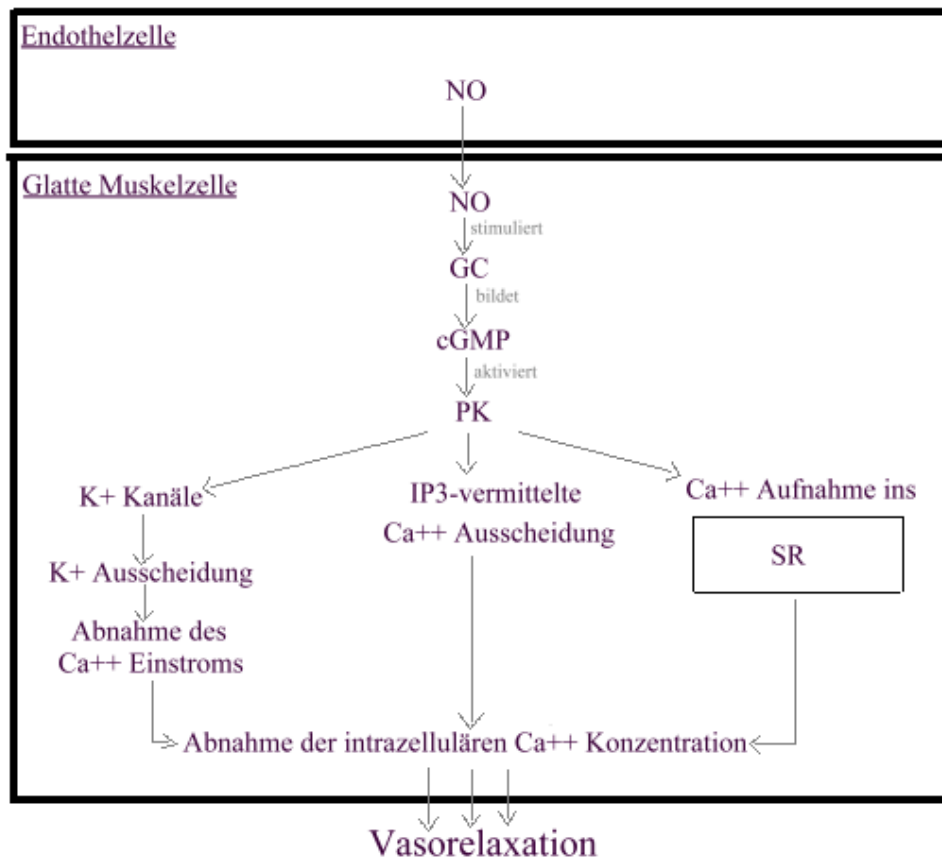


Abb. 10: Dargestellt ist die NO-abhängige Vasorelaxation. NO aktiviert die Guanylatcyclase (GC) zur Bildung des cyclischen Guanosinmonophosphates (cGMP), welches dann die cGMP-abhängige Proteinkinase (PK) aktiviert. Die PK phosphoryliert eine Reihe von intrazellulären Proteinen, die zu einer Abnahme der freien intrazellulären Calciumkonzentration führen. Die Folge hiervon ist schließlich eine Vasorelaxation. (NO=Nitridoxid, SR=sarkoplasmatisches Retikulum, IP3=Inositoltriphosphat) (mit freundlicher Genehmigung modifiziert aus {Gewaltig MT, Kojda G 2002})

NO diffundiert sehr leicht durch die Zellmembran und führt in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu einer Stimulation der löslichen Guanylatcyclase {Murad 1978}, welches die Bildung von cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert.

Das cyclische GMP führt durch Ausschleusung des intrazellulären Kalziums und Rückresorption ins sarkoplasmatische Retikulum zu einer Abnahme des Kalziums in der Zelle. Dies führt zu einer verminderten Phosphorylierung des Myosins und damit zur Lösung der Brü-

ckenverbindungen mit Actin. Letztendlich kommt es dadurch zur messbaren Relaxation der Gefäßwand.

In unseren Versuchen konnten wir feststellen, daß nach der durch 1 μ M ACH induzierten kurzandauernden Vasorelaxation eine weitere Dosiserhöhung des ACH zu einer weiteren Vasorelaxation führte. Besonders auffällig war es, daß nach mehrmaliger ACH Gabe plötzlich eine relativ starke Vasokontraktion erfolgte. Hierbei ist anzunehmen, daß eine ACH-Überdosierung direkt über die muscarinergen (M3)-Rezeptoren der glatten Muskelzellen zu einer G-Protein vermittelten Aktivierung von Phospholipase C führt. Nachfolgend kommt es dadurch zum Anstieg der intrazellulären Überträgersubstanz Inositol-Triphosphat, die ihrerseits zu einer Erhöhung der Kalzium-Konzentration in der Zelle führt. Die Folge ist eine Vasokontraktion, die wir beobachten konnten. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen konnte auch De Mey in seinen tierexperimentellen Studien feststellen, daß niedrige ACH-Dosen zu einer Dilatation und hohe Dosen zu einer Kontraktion führen {De Mey 1982}.

Wir konnten nachweisen, daß die endothelabhängige Vasorelaxation in beiden Lösungen innerhalb weniger Stunden abnahm, wobei in der UW-Lösung eine ACH-abhängige Vasorelaxation noch bis zu 48 Stunden nachweisbar war. Im Gegensatz dazu konnten wir in der HTK-Lösung nach 48 Stunden in keinem der Venensegmente eine Vasorelaxation feststellen. Santoli konnte 1994 in seinen Studien mit heparinisiertem autologem Blut und der UW-Lösung ebenfalls die Überlegenheit der UW-Lösung bezüglich der Endothelkonservierung bis zu 5 Stunden nachweisen {Santoli 1994}.

Santoli konservierte jeweils 8 humane Saphena-Venen im direkten Vergleich zur UW-Lösung auch in NaCl-Lösung und autologem Blut. Bereits nach 5 Stunden zeigten alle Proben mikroskopisch Endothelläsionen, wobei dies am geringsten in der UW-Lösung ausgeprägt war. Die deutlichsten Endothelschäden beobachtete er in autologem Blut.

Cavallari untersuchte 1995 und 1997 an Jugular und Femoral-Venen von Kaninchen die Auswirkungen der Konservierung auf den vaskulären Funktionszustand und den morphologischen

Endothelstatus. Er verglich in UW-Belzer-Lösung mit NaCl- Lösung und autologem Blut. Nach 24 Stunden Konservierung implantierte er die Venensegmente in Kaninchen und explantierte sie nach 6 Wochen, um den morphologischen Endothelstatus und Funktionalität der Explantate zu überprüfen. Am besten erhalten war das Endothel funktionell und morphologisch in den UW-konservierten Venen {Cavallari 1995/1997}.

Ungeklärt ist noch die Rolle des hohen Kaliumgehaltes (125 mmol/L) in der UW-Lösung auf das Endothel der Venen. Anastasiou {1997} stellte bereits nach 1 Stunde Konservierungszeit eine deutliche Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation mittels ACH und vermutete ursächlich den hohen Kaliumgehalt. Dagegen konnten wir {Bas 2000} übereinstimmend mit Mingoli {1995/1997} eine funktionstüchtige Endothelkonservierung über viele Stunden feststellen. Selbst nach einem Monat Konservierungszeit in der UW-Lösung wäre ein scheinbar funktionstüchtiges Endothel nachzuweisen, wobei hierbei aber eher von einer Reendothelialisierung der Intima auszugehen ist.

Ähnliche Ergebnisse zeigten 1995 Vischjager et al. mit UW-konservierten Hundearterien. Jeweils zehn Arterientransplantate wurden in Phosphat gepufferter NaCl-Lösung und zum Vergleich in UW-Lösung bei 4°C für 22 Tage konserviert. Während in der Phosphat gepufferter NaCl-Lösung bereits nach 3 Tagen kein Endothel mehr nachweisbar war, blieb in der UW-Gruppe eine funktionstüchtige Endothelschicht bis 14 Tage erhalten. Allerdings zeigten sie nach Implantation von UW-konservierten Arterien, im Gegensatz zu autogenen UW-konservierten Implantaten, daß es ohne eine adäquate Immunsuppression zu einer Transplantatabstoßung kommt {Vischjager 1995}. 1997 testete Vischjager die UW-Lösung auch bei Rattenarterien und erlangte ebenfalls ähnlich positive Konservierungsergebnisse {Vischjager 1997}.

Der rasche Untergang des Endothels in venösen Gefäßsegmenten kann auch gewebsspezifisch sein, da venöse Endothelzellen deutlich vulnerabler sind als arterielle {Kojda et al.1994}. Auch bezüglich der Freisetzung des NO (endothelium-derived relaxing factor) scheint es zwi-

schen Arterien und Venen Unterschiede zu geben {Lüscher 1988}. Kojda et al. {1994} verglichen bei 58 Patienten die endothelabhängige Vasorelaxation zwischen arteriellen (A. mammaria) und venösen (V. saphena) Gefäßen mittels ACH und stellten bei Arterien durchschnittlich eine 86 %-ige und bei Venen, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen {Bas 2000}, nur eine 39 %-ige Vasorelaxation fest. Vergleichbare Ergebnisse erzielten wir auch in späteren Studien mit heparinisiertem autologen Blut als Konservierungsmedium {Saklak, Bas 2001}. Eine Rolle spielt fernerhin auch, daß venöse Gefäßwände eine dünnere Intima und weniger glatte Muskelzellen besitzen, so daß eine schwächere Vasorelaxation und Kontraktion auch anatomisch mitbedingt ist.

Es konnte gezeigt werden, daß bei der Entnahme zur Transplantation vorgesehener Venen äußerste Sorgfalt zu üben ist, um traumatische Endothelläsionen zu vermeiden. Venenwände sind sehr vulnerabel und reagieren empfindlich auf Zug oder mechanische Kompression (Pinzettengriff). Dies erklärt bei unseren Versuchen, daß von 49 untersuchten Venensegmenten 22 a priori nur minimale bzw. keine funktionelle Reaktion zeigten.

Auch Davies stellte 1994 an Venensegmenten perioperative Schäden am Endothel fest, welches sich nach der Implantation im Gegensatz zur glatten Muskelatur nicht mehr regenerierte {Davies 1994}. Tatic postulierte 1995, daß perioperative Endothelschäden nach einer Implantation für unerwartete Okklusionen mitverantwortlich seien {Tatic 1995}. Besonders gefährdet sind die Enden der Venentransplantate, da sie bei unsachgemäßer Fixierung mittels Pinzette, oder bei der Anastomosennaht lädiert werden. Andere Autoren beobachteten v.a. an Anastomosenstellen Intimahyperplasien, die dann zu Frühokklusionen führten {Gruss 1992; Kobayashi 1993; Zund 1994}.

5.6 Morphologischer Endothelstatus

Bei der Raster-Elektronen-Mikroskopischen Untersuchung wurden in beiden Konservierungsmedien, nach 3 h Preservation, 81.3 % der ursprünglichen Endothelschicht nachgewie-

sen (Tab.10). Vergleichsweise wurden in beiden Untersuchungslösungen bei der funktionellen Analyse des Endothels nach 3 h Preservation maximal 35 % Dilatation beobachtet (Tab.9). Auch in den weiteren Zeitabschnitten gab es zwischen dem morphologischen und funktionellen Endothelstatus eine große Diskrepanz, so konnten zum Beispiel in den HTK-Venen nach 48 h Konservierung keinerlei endothelabhängige Relaxation mehr festgestellt werden, obwohl morphologisch die Endothelerhaltung 62.5 % betrug. Diese Beobachtungen zeigen, daß ein morphologisch nachgewiesenes Endothel keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Funktionalität und damit auf die Vitalität des Endothels zu läßt. Festzuhalten wäre, daß die morphologischen Schäden am Endothel zwar nicht direkt mit der Vitalität verbunden sind, aber dennoch im Laufe der Konservierungszeit entsprechend dem Funktionsverlust, signifikant zunehmen (Abb.7). Nach unseren Ergebnissen sind ausschließlich auf morphologischer Ebene erzielte Beobachtungen für die Beurteilung einer Konservierungslösung unzureichend.

Auch Zerkowski {1993 } konnte in seinen Experimenten mit humanen Vena-saphena-Transplantaten feststellen, daß eine morphologische Untersuchung des Endothels mittels Lichtmikroskopie oder Raster-Elektronen-Mikroskopie keinerlei Hinweise über den Funktionszustand des Endothels gibt. So führte er ebenfalls wie in unserer Studie zur Beurteilung des Funktionszustandes des Endothels bei vorkontrahierten Venensegmenten Dilatationstest mit Acetylcholin durch.

Den von Vischjager {1995/1997} beobachteten funktionellen und auch morphologischen Nachweis eines intakten Endothels, nach 14 Tagen Konservierung in der UW-Lösung, können wir nach unseren Ergebnissen nicht bestätigen {Bas 2000}. Nach 96 h Konservierung konnten wir zwar noch morphologisch maximal 37.5 % (Abb. 7) erhaltenes Endothel feststellen, aber in keinem der Venensegmente funktionelle Dilatationen nachweisen (Abb. 6).

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte auch Santoli {1994} morphologische Endothel einbußen bereits ab 5 Stunden Konservierung in seinen Studien feststellen. Er konser-

vierte Vena-saphena-Transplantate von 8 Patienten jeweils in der UW-Lösung, heparinisiert-physiologischer NaCl-Lösung und heparinisiertem Vollblut. Nach jeweils 30 min, 5 h und 24 h Konservierungszeit erfolgte die Untersuchung seiner Venensegmente. Dabei beobachtete er im heparinisierten Vollblut die morphologisch schlechtesten Ergebnisse über alle Untersuchungszeitpunkte. Nach 5 h zeigten alle Lösungen morphologische Endothelläsionen, wobei sie in der UW-Lösung am geringsten waren.

Konerding {1996} befaßte sich mittels der Raster-Elektronen-Mikroskopie ausschließlich mit den morphologischen Veränderungen von humanen Saphena-Venen, die er in der HTK-Lösung, im heparinisierten Vollblut und in heparinisierter physiologischer NaCl-Lösung konservierte. Gegenüber Santoli {1994} konnte er im heparinisierten Vollblut das am besten erhaltene Endothel nachweisen.

Weitere Autoren untersuchten unabhängig voneinander die morphologischen Endothelveränderungen abhängig von perioperativen Dehnungsdruck der Venensegmente {Bonchek 1980; Gundry 1980}. Ein Jahr später befaßten sich Haase {1981} und Hofer {1981} ebenfalls mit den morphologischen Endothelschäden, abhängig von der Höhe des Dehnungsdruckes der Venensegmente. Sie zeigten, daß bei zunehmenden Dehnungsdruck größere Endothelschäden auftraten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es unzureichend ist, eine Konservierungslösung allein aufgrund von morphologischen Kriterien zu beurteilen. So konnte auch Wagner {1992} bei seinen Untersuchungen mit humanen Saphena Venen und tierischen Venen, die er 90 min lang in einer Collins-Lösung oder im heparinisierten Vollblut aufbewahrte, keinerlei morphologische Unterschiede feststellen. Die funktionelle Kapazität des Endothels widerspiegelt am ehesten die Vitalität des Endothels wieder, zumal eine Acetylcholin induzierte NO-Freisetzung und folgend eine Vasodilatation nur bei vitalen Endothelzellen möglich ist. Ein vitales Endothel zeigt bei einer Implantation die beste Offenheitsrate {Zilla 1993}. Endothelschä-

den mit funktionellen Defiziten führen später gehäuft zu Intimahyperplasien und progredienter Arteriosklerose {Zilla 1993}.

5.7 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Daten weisen darauf hin, daß bei einer 48 stündigen Konservierung von humanan Vena-saphena-magna-Transplantaten in der UW-Belzer-Lösung die endotheliale und glattmuskuläre Funktion besser erhalten wird, als bei einer Konservierung in der HTK-Lösung. Vor allem in Bezug auf den α_1 -rezeptorabhängigen Funktionsstatus der Venen zeigt die UW-Lösung bessere Konservierungsergebnisse als die HTK-Lösung. Die günstige Konservierbarkeit des glattmuskulären kontraktiven Apparates in der UW-Lösung wird auch in den Studien von Santoli (1994), Vischjager (1995/1997) und Mingoli (1995/1997) bestätigt. Hinsichtlich morphologischer Endothelveränderungen konnten zwischen den Lösungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Morphologische Beobachtungen reichen allein aber nicht aus, um die Vitalität des Endothels festzustellen. Hier eignen sich funktionelle Analysen besser.

Die Lagerung der Gefäßtransplantate sollte nach unseren Untersuchungen in der UW-Belzer-Lösung erfolgen, da eine Biostabilität bis zu 48 h garantiert werden kann. Eine Konservierung länger als 48 h ist in Anbetracht unserer Ergebnisse nicht zu empfehlen.

6. Zusammenfassung

Konservierung und Preservation vaskulärer Transplantate (Tx) sind seit langem umstritten, ebenso wie ein immunologischer Monitoring und eine Immuntherapie bei allogenen Gefäßen oft für nicht erforderlich gehalten wird. Auf der Grundlage humaner allogener Venentransplantationen (VTx) wurde diese Konservierungsstudie initiiert, mit der die Haltbarkeit der zellulären Vitalität und die funktionelle Leistungsfähigkeit isolierter VTx geprüft werden soll.

Methoden:

27 humane Venensegmente (V. saphena magna) wurden nach Entnahme in UW- oder HTK-Lösung bei 4°C gelagert. Nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h erfolgte jeweils die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Venensegmente. Hierzu wurden die Gefäße in eine Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Organbadlösung verbracht und in einen Spannungsaufnehmer gespannt. Die Kontraktionsprüfung erfolgte mit KCl (80mM) und Phenylephrin (PE, 0.2, 2, 20 µM). Die endothelabhängige Vasorelaxation wurde durch Zugabe von 1 µM Acetylcholin (ACH) erfasst. Zur morphologischen Begutachtung der Venensegmente wurde die Raster-Elektronen-Mikroskopie eingesetzt (625-bzw. 1025 fache Vergrößerung).

Ergebnisse:

Eine endothelabhängige Vasorelaxation mittels ACH konnten wir in der UW-Lösung bis zu 48 h und in der HTK-Lösung bis zu 24 h nachweisen. Die KCl- induzierte Vasokontraktion blieb nach 48 h in der UW-Lösung um 7 % besser erhalten als die mit maximaler Phenylephrin-Konzentration (20 µM) induzierte Vasokontraktion. Die UW-Lösung zeigte bei der PE-induzierten (0.2 µM) Vasokontraktion nach 48 h eine signifikante Überlegenheit gegenüber der HTK-Lösung (p=0.006). Bedeutsam war auch die Überlegenheit der UW-Venen gegenüber den HTK-Venen bei der durch 2 µM PE induzierten Vasokontraktion. Die durch 2 µM PE induzierte Kontraktionskraft blieb in der UW-Lösung nach 24 h zu 82 % und nach 48 h zu

55 % erhalten ($p=0.14$). Bei Konservierung in der HTK-Lösung lagen diese Werte bei nur 75 % nach 24 h und 49 % nach 48 h. Bei der morphologischen Untersuchung konnte man bereits nach 3 h Konservierung Endothelschäden feststellen, welche in beiden Lösungen einen prozentualen Verlust des ursprünglichen Endothelstatus um 19 % ausmachten. Im Laufe der Konservierungszeit gab es zwischen den Lösungen hinsichtlich der Morphologie keine signifikanten Unterschiede. Nach 48 h Konservierung zeigten beide Lösungen größere Endothelschäden, die in der UW mit 69 % etwas besser ausfielen, als in der HTK (63 %). Abweichend von der funktionellen Analyse des Endothels wurden über die gesamte Konservierungszeit hinweg in beiden Lösungen auf morphologischer Ebene teilweise noch erhaltenes Endothel festgestellt.

Schlußfolgerung:

Die Daten weisen darauf hin, daß eine 48 h Konservierung von humanen Vena-saphenamagna-Transplantaten in der UW-Lösung die endotheliale und glattmuskuläre Funktion besser erhält als die Konservierung in HTK-Lösung. Hinsichtlich morphologischer Endothelveränderungen konnten zwischen den Lösungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nach unseren Ergebnissen sind ausschließlich auf morphologischer Ebene erzielte Beobachtungen für die Beurteilung einer Konservierungslösung unzureichend. Nur eine funktionelle Analyse läßt Schlußfolgerungen auf die Vitalität eines Venentransplantats zu.

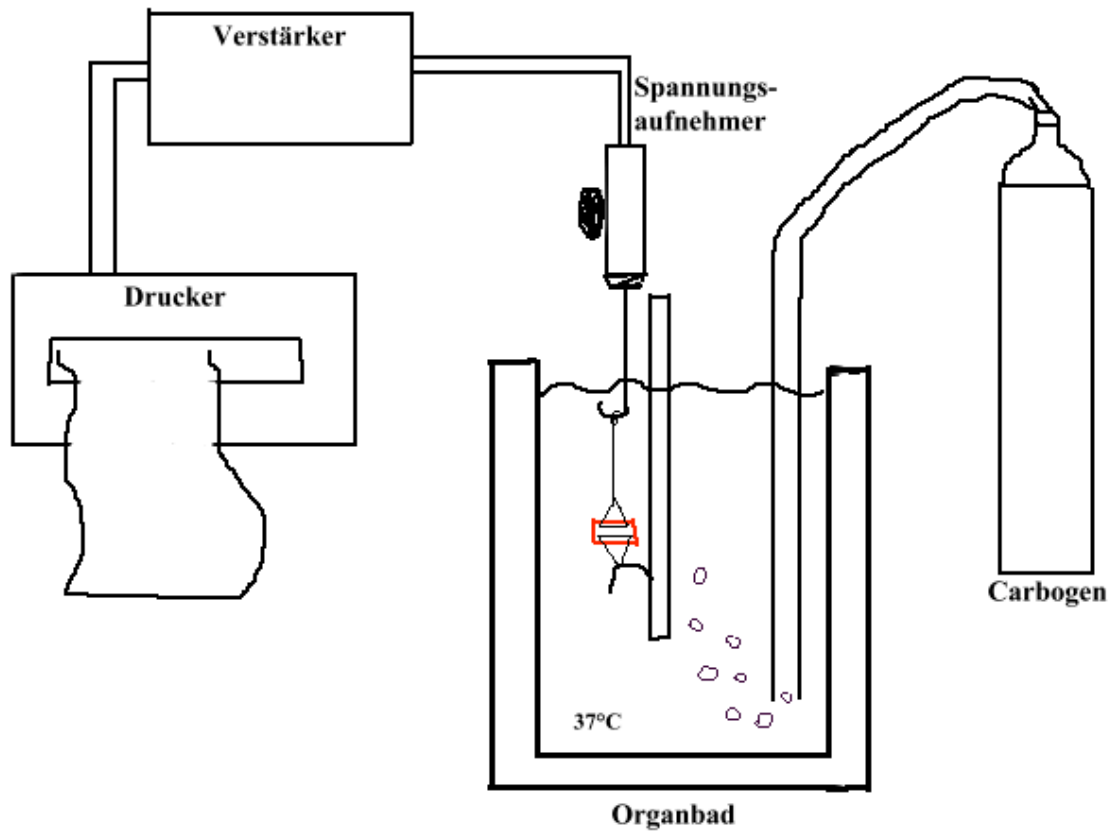


Abb. 11: Dargestellt ist schematisch ein Organbad mit eingehängtem Gefäßring zwischen zwei Triangeln. Das Organbad war auf 37°C konstanter Temperatur eingestellt. Eine Carbogenflasche lieferte die dem In-vivo-Zustand angepaßte notwendige Gaskombination. Die Vasokontraktionen und Vasodilatationen wurden durch den Spannungsaufnehmer registriert, verstärkt und dann als Kurve ausgedruckt.

7. Literaturübersicht

1. Anastasiou N (1997) Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein. *J Vasc Surg* 25: 713-721
2. Azuma N (1999) Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: Fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 29: 694-702
3. Bas M (2000) Preservation of endothelial and smooth muscle function of human saphenous veins transplants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* 361: 117 (abstract)
4. Bellong JM (1999) Arterial damage induced by cryopreservation is irreversible following organ culture. *Eur J Endovasc Surg* 17: 136-143
5. Belzer FO (1967) 24- and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* 2: 536
6. Belzer FO, Southard JH (1986) Organ preservation and transplantation. *Transplantation* 291-303
7. Belzer FO, Southard JH (1988) Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676
8. Blaheta RA (1998) In vitro Untersuchungen zum Einfluß von Mycophenolat Motefil auf die lymphozytären Adhäsionsrezeptoren. *Transplantationsmedizin* 10: 74
9. Boeken U (1993) Cryopraeservierte, homologe Venen als Gefäßersatz zur Beinerhaltung. *Med. Diss. Düsseldorf.*
10. Bolton TB (1978) Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59: 625-632
11. Bonchek LI (1980) Prevention of endothelial damage during preparation of saphenous veins for bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 79: 911-915
12. Brockbank KGM (1994) Effects of cryopreservation upon vein function in vivo. *Cryobiology* 31: 71-81

13. Bujan JR (2000) Thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Endovasc Surg* 20: 13-20
14. Calhoun AD (1977) Fresh and cryopreserved venous allografts in genetically characterized dogs. *J Surg Res* 22: 687
15. Carrel A (1912) The preservation of tissues and its applications in Surgery. *JAMA* 59: 523
16. Castier Y (1999) Early experience with cryopreserved arterial allografts in below-knee revascularization for limb salvage. *Am J Surg* 177: 197-202
17. Cavallari N (1995) UW-solution effects on intimal proliferation in canine autogenous vein grafts. *J Surg Res* 59: 433-40
18. Cavallari N (1997) Short-term preservation of autogenous vein grafts: effectiveness of UW-solution. *Surg* 121: 64-71
19. Cavallari N (1997) Functional and morphological evaluation of canine veins following preservation in different storage media. *J Surg Res* 68: 106-15
20. Churchill TA (1998) Investigation of a primary requirement of organ preservation solutions: supplemental buffering agents improve hepatic energy production during cold storage. *Transplantation* 65: 551-559
21. Collins GH (1969) Kidney preservation for transplantation. Initial perfusion and 30 hour ice storage. *Lancet* 1969 2: 1219-1222
22. D'Alessandro A, Kalayoglu M, Southard JH (1987) Comparison of cold storage and perfusion of dog livers on function of tissue slices. *Cryobiology* 23: 161-167
23. Davies MG (1994) Structural and functional consequences of bypass grafting with autologous vein. *Cryobiology* 31: 63-70
24. Davies MG (1994) Influence of perioperative storage solutions on long-term vein graft function and morphology. *Ann Vasc Surg* 8: 150-157

25. Davies MG (1999) Controlling transplant vasculopathy in cryopreserved vein grafts with polyethylene glycol and glutathione during transport. *Eur J Endovasc Surg* 17: 493-500
26. De Mey JG (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res* 51: 439-447
27. Delmas-Beauvieux MC (1993) ³¹P NMR studies of rat liver cold preservation with histidine-buffered lactobionate solution. *Cryobiology* 30: 551-61
28. Deterling Jr (1951) Experimental studies of the frozen homologous aortic graft. *Surg* 29: 419
29. Dunphy G (1999) The effects of mannitol, albumin, and cardioplegia enhancers on 24-h rat heart preservation. *Am J Physiol* 276: 1591-1598
30. Freeman BA (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426
31. Furchgott RF (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* Vol 288: 373-6
32. Furchgott RF (1981) The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. *Trends Pharmacol Sci* 2: 173-176
33. Gewaltig MT, Kojda G (2002) Vasoprotection by Nitric Oxide: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Cardiovasc Res* 2002, in press
34. Goldfarb RD (1989) Regulation of lysosomal membrane stabilization via cyclic nucleotides and prostaglandins: the effects of steroids and indomethacin. *Prog Clin Biol Res* 111: 147-66
35. Grohs JG (1996) Contractile function of human veins after long-term storage in different media. *J Cardiovasc. Pharmacol* 28: 89-93
36. Grundry SR (1980) Optimal preparation techniques for human saphenous vein grafts. *Surgery* 88: 785-794

37. Gruss JD (1992) 17 Jahre Erfahrungen mit dem Vena saphena magna in situ Bypass. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 460-461
38. Guldutuna S (1993) Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 104: 1736-1744
39. Guthrie CC (1908) Structural changes and survival of cells in transplanted blood vessels. *JAMA* 28: 1035
40. Harris RW (1993) Allograft vein bypass: Is it an acceptable alternative for infrapopliteal revascularization? Original article. Presented at the Eighth Annual Meeting of the Western Vasc Society Sonoma Calif. 9-12
41. Hasse J (1981) Morphologic studies in saphenous vein grafts for aorto-coronary bypass surgery. Part II: Influence of a pressure-limited graft dilatation. *Thorac Cardiovasc Surg* 29: 38-40
42. Hidalgo MA (1995) Effects of hypothermic storage on the vascular endothelium: a scanning electron microscope study of morphological change in human vein. *J Cardiovasc Surg* 36: 525-532
43. Hochachka PW (1986) Defense strategies in hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234-241
44. Hofer H (1981) Morphologic studies in saphenous vein grafts for aorto-coronary bypass surgery. Part I: Morphology of the graft using ordinary surgical preparation techniques. *Thorac Cardiovasc Surg* 29: 32-37
45. Ignarro LJ (1987) Endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF) release from perfused artery and vein: Arterial EDRF relaxes vein and venous EDRF relaxes artery. *Blood vessels* 24: 209
46. Jarvelainen H (1985) The stabilizing effect of glucocorticoids on human endothelial cells in culture. *Scand J Clin Lab Invest* 45: 223-228

47. Karwinski W (1993) Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *Eur J Surg* 159: 355-359
48. Kirsch J (1999) Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *VASA* 28: 95-99
49. Kobayashi T (1993) Histological study of saphenous vein graft disease after coronary artery bypass grafting. *Nippon Kyobu Geka Zasshi* 41: 592-597
50. Kojda G, Beck JK (1994) Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna: dependence on intact endothelium. *Br J Pharmacol* 112: 533-40
51. Kolvenbach R, Sandmann W (1992) Cryopreserved, homologous veins as vessel substitutes for maintenance. *Z Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie* 6: 45-48
52. Konerding MA (1996) Impact of the incubation medium on the endothelium of autologous vein grafts: damage scoring by scanning electron microscopy. *Scanning Microsc* 10: 841-8
53. Langhammer B (1987) Optimierung der intraoperativen protektion ischämischer Venentransplantate. Metabolische und morphologische Untersuchungen an menschl. Venen. *Med. Diss. Düsseldorf.*
54. Lasalde JA (1996) Tryptophan substitutions at the lipid-exposed transmembrane segment M4 of *Torpedo californica* acetylcholine receptor govern channel gating. *Biochemistry* 35: 14139-14148
55. Lugovoj VI (1980) Effect of steroid hormones on the stability of isolated lysosomes during freezing. *Vopr Med Khim*; 26:620-623
56. Lüscher TF (1988) Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 319: 462-467
57. MacKnight ADC (1977) Regulation of cellular volume. *Physiol Rev* 57: 510-573

58. Martin PR, Scott DF, Belzer FO, (1972) Primary cause of unsuccessful liver and hearth preservation: Cold Sensitivity of the ATPase system. *Ann Surg* 175: 111-117
59. Mazor D (1990) Prolonged storage of red cells with ammonium chloride and mannitol. *Transfusion* 30: 150-153
60. McGeachie JK (1983) Vein grafts for arterial repair: an experimental study of the histological development of the intima. *Ann R Coll Surg Engl* 65: 85-9
61. Mingoli A, Cavallari N (1997) Short-thermpreservation of autogenous vein grafts: effectiveness of University of Wisconsin solution. *Surgery* 121: 64-71
62. Mingoli A, Cavallari N (1995) University of Wisconsin solution effects on intimal proliferation in canine autogenous vein grafts. *J Surg Res* 59: 433-440
63. Mitchell SJ, Churchill TA (1996) Effects of different cold preservation solutions on restoration of hepatic energy metabolism during cold reperfusion. *Cryobiology* 33: 413-422
64. Murad F (1978) Guanylate cyclase: activation by azide nitrocompounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Nucleotide Res* 9: 145-158
65. Ochsner JL, Lawson JD (1984) Homologous veins as an arterial substitute: long-term results. *J Vasc Surg* 1: 306-13
66. Palmer RM (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* Vol 327: 11
67. R uth RG (1992) Langzeitkonservierung von homologen Venentransplantaten und alternativen Gef a prothesen in der Koronar und Gef a chirurgie. *Med. Diss. D usseldorf.*
68. Saklak M, Bas M (2001) Effects of storage solutions on endothelial and smooth muscle functions of human saphenous vene transplants. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch of Pharmacol* Vol 363: 4 (abstract)
69. Santoli E (1993) University of Wisconsin solution and human saphenous vein graft preservation: preliminary anatomic report *Eur J Cardiothorac Surg* 7: 548-52

70. Santoli E (1994) Effects of storage with University of Wisconsin solution on human saphenous vein endothelium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 382-383
71. Shimada Y, Yamamoto F (1995) The effects of glucose and insulin upon functional recovery in the rat heart preserved by continuous perfusion with St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 43: 973-981
72. Shimada Y, Yamamoto F (1996) The effect of continuous perfusion with St. Thomas' Hospital cardioplegic solution containing glucose, insulin and L-aspartate on functional recovery after myocardial preservation in the rat *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 44: 1742-1748
73. Slobozhanina EI (1991) Change of state of erythrocyte membrane proteins during storage of preserved blood. *Biofizika* 36: 621-623
74. Somlyo AP, Himpens B (1989) Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 3: 2266-2276
75. Southard JH, Senzig KA, Belzer FO (1980) Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. *Cryobiology* 17: 148-153
76. Southard JH (1983) Synthetic perfusate for kidney preservation. Its use in 72-hour preservation of dog kidneys. *Arch Surg*; 118:919-921
77. Southard JH, Lutz MF (1984) Stimulation of ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys by adenosine and PO_4 *Cryobiology* 21: 13-19
78. Southard JH (1984) effects of hypothermic perfusion of kidneys on tissue and mitochondrial phospholipids. *Cryobiology* 21: 20-24
79. Southard JH, Belzer FO (1995) *Annu Rev Med* 46: 235-47
80. Stich R, Makkas M, Dowman CE (1907) Beiträge zur Gefäßchirurgie , circuläre Arterien-naht und Gefäßtransplantationen. *Beitr z klin Chir* 53: 113
81. Stockmann U (1974) Problem of arterial replacement an experimental and clinical report. *Thoraxchir Vasc Chir* 22: 508-511

82. Sumimoto RA, Kamada N (1991) Comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation* 51: 589-593
83. Takeuchi K, Takashima K (1995) Improved protection of hypertrophied myocardium in ischemia by histidine buffer cardioplegia. *Kyobu Geka* 48: 461-463
84. Tatic V (1995) Morphological analysis of saphenous vein used for aortocoronary graft. *Vojnosanit Pregl* 52: 311-24
85. Tice DA, Santoni E (1970) Use of saphenous vein homografts for arterial reconstruction: a preliminary report. *Surgery* 67: 493-8
86. Tice DA (1972) Clinical experience with preserved human allograft for vascular reconstruction. *Surg* 72: 260-267
87. Upadhyga GA, Strasberg SM (2000) Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 31: 1115-1122
88. Van Leeuwen EB (2000) Scanning electron microscopic analysis of endothelial cell coverage and quality in large vessels from multi-organ donors: effects of preservation on endothelial cell integrity. *Clin Transplant* 14: 246-251
89. Vischjager M (1995) Morphology and function of dog arterial grafts preserved in UW-solution *Eur J Vasc Endovasc Surg* 10: 431-9
90. Vischjager M (1997) Morphology and function of preserved microvascular arterial grafts: an experimental study in rats *Ann Vasc Surg* 11: 284-91
91. Wagner R (1992) Protection of the tunica intima during preservation of venous bypass grafts from harvesting to implantation. *Helv Chir Acta* 58: 509-513
92. Wallace BA (1999) Tryptophans in membrane proteins. X-ray crystallographic analyses. *Adv Exp Med Biol* 467: 789-799

93. Wickens DG (1987) Free radicals in hypothermic rat heart preservation--prevention of damage by mannitol and desferrioxamine. *Free Radic Res Commun* 4: 189-195
94. Yau WM, Wimley WC (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37: 14713-14718
95. Zerkowski HR (1993) Endothelial damage of the venous graft in CABG. Influence of solutions used for storage and rinsing on endothelial function. *Eur J Cardiothorac Surg* 7: 376-382
96. Ziemiński S (1982) Role of free radicals in the aging process. *Pol Tyg Lek* 37: 1453-6
97. Zilla P (1993) The endothelium: a key to the future. *J Card Surg* 8: 32-60
98. Zund G (1994) Standardisierte Nachkontrolle nach peripheren Bypassoperationen. *Helv Chir Acta* 60: 757-760

Danksagung

Für die Überlassung der Promotionsarbeit und die Hilfe bei deren organisatorischen Durchführung danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Dr. med. Bernd Luther, der mich auch in schwierigen Zeiten motivierte. Geduldig führte er die intensive Durchsicht der Promotionsarbeit durch.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Georg Kojda vom Pharmakologischen Institut der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, der großzügig sein Labor und notwendige Materialien zur Verfügung stellte. Er nahm sich immer Zeit für mich und betreute mich stets hilfsbereit. Geduldig brachte er mir das wissenschaftliche Arbeiten bei und gab mir zahlreiche nützliche Tips. Ohne die Hilfe von Ihm wäre die Arbeit kaum durchführbar gewesen.

Den pharmazeutischen Doktorandinnen Martina Weber und Nadine Lauer danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung, vor allem bei der Lösung von technischen Schwierigkeiten.

Frau Dr. med. Petra Reinecke, vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Düsseldorf, danke ich für die morphologische Begutachtung der fixierten Venensegmente.

Herrn Prof. Dr. med. Emeran Gams und seinem kardiochirurgischen Team des Universitätsklinikums Düsseldorf danke ich für die freundliche Bereitstellung der Venensegmente.

Publikationen in Zusammenhang mit dieser Dissertation:

1. Bas M, Saklak M, B Luther, Kojda G, Sandmann W (2000) Preservation of endothelial and smooth muscle function of human saphenous veins transplants. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch of Pharmacol Vol 361: 117 (abstract)
2. Saklak M, Bas M, B Luther, Kojda G, Sandmann W (2001) Effects of storage solutions on endothelial and smooth muscle functions of human saphenous vene transplants. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch of Pharmacol Vol 363: 4 (abstract)
3. B Luther, Bas M, Saklak M, Kojda G, Reinecke P (2002) Konservierung der morphologischen und funktionellen Eigenschaften menschlicher Venenexplanate. Transplantation (eingereicht)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Murat Bas
 Geburtsdatum: 11.10.1973 in Düsseldorf
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet, eine 6-jährige Tochter

Schulbildung

1980-1993 Grundschole und Lessing-Gymnasium in Düsseldorf

Berufsausbildung

1993-1995 Ausbildung zum Zytologieassistenten
 in der Lehranstalt für Assistenten in der Zytologie der
 Universität Düsseldorf, bei Prof. Dr. med. Böcking
 Abschluß: Staatsexamen

Studium

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-
 Universität Düsseldorf

1997 Ärztliche Vorprüfung
 1998 1. Staatsexamen
 2000 2. Staatsexamen
 2001 3. Staatsexamen

Auslandsaufenthalt:

Juni-September 2001 Regionalspital Visp (Schweiz), im Rahmen des Chirurgi-
 sches Tertials im praktischen Jahr

Beruf:

Seit Dezember 2001 Arzt im Praktikum in der Hals-Nasen und Ohren Klinik
 des Universitätsklinikum Düsseldorf

Erhaltung endothelialer und glattmuskulärer Funktionen von humanen Vena saphena magna Transplantaten.

Murat Bas

EINLEITUNG: Die Nutzung postmortaler Venen spielt in der allogenen Gefäßtransplantation eine große Rolle. Während die Antigenität dieser Venen durch eine Immunsuppression adäquat behandelt werden kann, ist deren optimale Preservation noch umstritten. Frühere Studien zeigten einen protektiven Effekt niedrig dosierter NaCl-Lösungen auf das vaskuläre Endothel. Diese Studien basierten jedoch auf der Untersuchung von pH-Veränderungen des Endothels. Die Preservation endothelialer Funktionen, wie die NO abhängige Vasorelaxation, induziert durch Acetylcholin, und die Wirkung von Vasokonstriktoren waren bisher nicht untersucht worden. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die endothelialen und glattmuskulären Funktionen der humanen Vena-saphena-magna-Transplantaten nach Preservation in der HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) und in der UW-Lösung (University of Wisconsin).

METHODEN: 27 humane Venensegmente (V. saphena magna) wurden nach Entnahme in UW- oder HTK-Lösung bei 4°C gelagert. Nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h erfolgte jeweils die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Venensegmente. Hierzu wurden die Gefäße in eine mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Organbadlösung verbracht und in einen Spannungsaufnehmer gespannt. Die Kontraktionsprüfung erfolgte mit KCl (80 mM) und Phenylephrin (PE, 0,2, 2, 20 µM). Die endothelabhängige Vasorelaxation (EDR) wurde durch Zugabe von 1 µM Acetylcholin (ACH) erfasst. Zur morphologischen Begutachtung der Venensegmente wurde die Raster-Elektronen-Mikroskopie eingesetzt (625- bzw. 1025 fache Vergrößerung).

ERGEBNISSE: Nach 24 h Konservierung war die KCl-abhängige Vasokonstriktion der Venen zwischen der HTK-Lösung (89 %, n=13) und der UW-Lösung (88 %, n=14) ähnlich. Nach 48 h zeigten die UW-Venen eine deutlich bessere Vasokonstriktion (72 %) als die HTK-Venen (60 %), die jedoch nicht signifikant war (p=0.08). Die UW-Lösung zeigte auch bei der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion gegenüber der HTK bessere Konservierungsergebnisse. Nach 48 h Konservierung waren die 0,2 µM PE-induzierten Vasokonstriktionen in der UW (66 %) signifikant besser (p=0.028) als in der HTK (58 %). Nach 96 h zeigten die UW-Venen noch 19 % Vasokonstriktion gegenüber nur 2 % in der HTK (p=0.006). Ähnliche Ergebnisse, die jedoch nicht signifikant waren, wurden auch bei der 2 µM PE-induzierten Vasokonstriktion erzielt. Die durch 2 µM PE induzierte Kontraktionskraft blieb in der UW-Lösung nach 24 h zu 82 % und nach 48 h zu 55 % erhalten. Bei Konservierung in der HTK-Lösung lagen diese Werte bei nur 75 % nach 24 h und 49 % nach 48 h. (p=0.379). Nach 96 h zeigten die UW-Venen bei 2 µM PE noch 28 % Vasokonstriktion gegenüber 19 % in der HTK (P=0.14). Bei der maximalen Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion mit 20 µM PE gab es zwischen beiden Lösungen im Laufe der Konservierungszeit keinerlei signifikante oder bedeutsame Unterschiede (p=0.6). Eine endothelabhängige Vasorelaxation mittels ACH konnten wir in der UW-Lösung bis zu 48 h und in der HTK-Lösung bis zu 24 h nachweisen. Bei der morphologischen Untersuchung konnte man bereits nach 3 h Konservierung Endothelschäden feststellen, welche in beiden Lösungen einen prozentualen Verlust der ursprünglichen Endothelschicht um 19 % ausmachte. Während der Konservierungszeit zeigten beide Lösungen einen signifikanten Verlust des Endothels (p<0.0001). Zwischen den Lösungen gab es jedoch hinsichtlich der Morphologie keine signifikanten Unterschiede. Nach 48 h Konservierung zeigten beide Lösungen vergleichbar große Endothelschäden (UW 69 % Restendothel, HTK 63 %).

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Daten weisen darauf hin, daß eine 48 h Konservierung von humanen Vena-saphena-magna-Transplantaten in der UW-Lösung die endotheliale und glattmuskuläre Funktion besser erhält als die Konservierung in HTK-Lösung. Hinsichtlich morphologischer Endothelveränderungen konnten zwischen den Lösungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nach unseren Ergebnissen sind ausschließlich auf morphologischer Ebene erzielte Beobachtungen für die Beurteilung einer Konservierungslösung unzureichend. Nur eine funktionelle Analyse läßt Schlußfolgerungen auf die Vitalität eines Venentransplantats zu.