

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Artur Lichtenberg

**Erhalt der Funktion und der Vitalität von  
Gefäßen mit verschiedenen Konservierungslösungen  
- eine experimentelle Studie an humaner Vena saphena magna -**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Verena-Constanze Buchinger-Kähler (geb. Buchinger)

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jochen D. Schipke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Meiner Familie  
Meiner Liebe

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungen</b>	<b>vi</b>
<b>II. Abbildungen</b>	<b>vii</b>
<b>III. Tabellen</b>	<b>x</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Geschichte der Vena saphena magna Transplantation	1
1.2 Vene als Organmodell	3
1.3 Grundsätze der Organkonservierung	4
1.3.1 Hypothermie (4 °C): Schutz und Schädigung	
1.3.2 Konservierungslösungen	
1.4 Endothelfunktion	8
1.5 Ziel der Studie	9
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Untersuchungen zur Funktion	12
2.1.1 Versuchsapparatur	12
2.1.2 Präparation der Venen	13
2.1.3 Versuchslösungen	15
2.1.4 Protokoll	18
2.1.5 Messung der Funktion	20
2.1.6 Konservierung und Lagerung	21
2.1.7 Statistik	21
2.2 Untersuchungen zur Morphologie	23
2.2.1 Färbung und Aufbereitung der Venen	25
2.2.2 Analyse	25
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1 Untersuchungen zur Funktion	26
3.1.1 K1: Rezeptor-unabhängig Kontraktion mit KCl	27
3.1.2 K2: Rezeptor-abhängige Kontraktion mit Phenylephrin (PE)	33
3.1.3 Endothel-abhängige Relaxation	38
3.2 Untersuchungen zur Morphologie	44
3.2.1 KHP-Gruppe	44
3.2.2 UW-Gruppe	46
3.2.3 TiPROTEC-Gruppe	48
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse: Funktion und Morphologie	49

<b>4. Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1 Methodenkritik	51
4.1.1 Grenzen der Organbadversuche	51
4.1.2 Qualität der Venen	51
4.1.3 Probenumfang, Statistik	52
4.2 Organkonservierungslösungen	52
4.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer	53
4.2.2 UW-Lösung	54
4.2.3 TiPROTEC	56
4.3 Chirurgisches Trauma	60
4.4 Venen als Modell	61
4.5 Untersuchung zur Funktion	62
4.5.1 Rezeptor-unabhängige Vasokonstriktion mit KCl	62
4.5.2 Rezeptor-abhängige Vasokonstriktion mit Phenylephrin	63
4.5.3 Endothelabhängige Relaxation mit ACh	65
4.5.4 Handhabung / Wirtschaftlichkeit	67
4.6 Untersuchung zur Morphologie	68
4.6.1 Methodik	68
4.6.2 Ergebnisse	69
4.7 Zusammenfassung der Diskussion	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>1</b>
Patientendatenbögen	1
Mittelwerte	2
<b>Lebenslauf</b>	<b>4</b>
<b>Danksagung</b>	<b>6</b>

## I. Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
c-GMP	zyklisches Guanosin-3'-5'- monophosphat
cP	Centipoise = mPa•s (milliPascal•Sekunde)
CS	Cold Storage
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat / Custodiol®
IE	internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KPSS	High potassium saline solution
LDH	Laktatdehydrogenase
mN	milliNewton
NaCl	Natriumchlorid, physiologische Kochsalzlösung
NO	Stickstoffmonoxid
PE	Phenylephrin
PG	Prostaglandin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
UW	University of Wisconsin Lösung / ViaSpan® nach Belzer
VSM	Vena saphena magna

## II. Abbildungen

- Abb. 1:** Schema zum Entstehungsmechanismus der kälteinduzierten Schädigung.
- Abb. 2:** Die Versuchsanordnung verfügte über je vier Organbäder. Der funktionelle Zustand der untersuchten Venenringe wurde über die entsprechenden Kraftaufnehmer untersucht.
- Abb. 3:** Für die Messungen standen jeweils vier Organbäder mit einem Füllungsvolumen von 10 ml zur Verfügung.
- Abb. 4:** Indometacin. Wikipedia, Zugriff am 1. Juni 2012 (public domain)
- Abb. 5:** Versuchsprotokoll, schematische Abfolge der einzelnen Versuchsschritte.
- Abb. 6:** Propidiumiodid. Wikipedia, Zugriff am 1. Juni 2012 (public domain)
- Abb. 7:** Intrazelluläre Umwandlung von CMFDA. modifiziert nach Invitrogen. Zugriff am 31. Mai 2012: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C7025>
- Abb. 8:** Schematischer Versuchsablauf der Studie zur Vitalität.
- Abb. 9:** Anteil der getesteten an der Gesamtzahl der Venen
- Abb. 10:** Versuchsablauf einer Beispielvene
- Abb. 11:** Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion. Hier aufgeführt sind die Mittelwerte in Beziehung gesetzt mit der prozentualen Veränderung (p.V.) vom Ausgangswert (100 % gesetzt) über die Zeit.
- Abb. 12:** Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion. Hier aufgeführt sind die Mittelwerte in Beziehung gesetzt mit der prozentualen Abweichung vom Ausgangswert (100 % gesetzt) über die Zeit.
- Abb. 13:** Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion. Hier aufgeführt sind die Mittelwerte in Beziehung gesetzt mit der prozentualen Abweichung (p.V.) vom Ausgangswert (100 % gesetzt) über die Zeit.
- Abb. 14:** Übersicht der Lösungen im KCl-Test
- Abb. 15:** Boxplotdarstellung der rezeptorunabhängigen Kontraktionskraft. Die Ergebnisse nach 3 h (t1) = blau und 72 h (t4) Konservierung = grün, wurden gegenüber gestellt. \*\* = hochsignifikanter Unterschied, \* = signifikanter Unterschied.
- Abb. 16:** Kontraktionskraft (mit SD) im Phenylephrin-Test über die Zeit, durch prozentuale Veränderung (p.V.) ergänzt. Die Kontrollvene (Kontrolle) ist nicht prozentual dargestellt. \* = signifikante Abnahme der Kraftentwicklung von 24h bis 48 h.

- Abb. 17:** Kontraktionskraft in UW-Lösung im Phenylephrin-Test über die Zeit, durch prozentuale Abnahme ergänzt.
- Abb. 18:** Kontraktionskraft von TiPROTEC im Phenylephrin-Test über die Zeit, durch prozentuale Veränderung (p.V.) ergänzt.
- Abb. 19:** Zeitlicher Verlauf aller drei Versuchsgruppen im Phenylephrin-Test.
- Abb. 20:** Boxplotdarstellung der Phenylephrin-Antwort nach 3 h (t1) = blau und 72 h (t4) = grün Konservierung. Ausreißer (Kreise) und Extremwerte (Sternchen) sind mit der Zahl in mN in der Grafik markiert.
- Abb. 21:** KHP-Gruppe. Relaxation durch Acetylcholin.
- Abb. 22:** Relaxation und SD bei UW-behandelten Präparaten.
- Abb. 23:** Relaxation und SD bei in Essener-Lösung konservierten Präparaten.
- Abb. 24:** Überblick der 3 Versuchsgruppen während der Relaxation über die 4 Versuchszeitpunkte. (links: absolute, rechts: relative Werte)
- Abb. 25:** Boxplotdarstellung der ACh-Antwort der drei Versuchsgruppen nach 3 h (t1) = blau und 72 h (t4) = grün Konservierung. Ausreißer (Kreise) sind mit der Zahl in mN in der Grafik markiert. (links: absolute, rechts: relative Werte)
- Abb. 26:** Venensegment aus der KHP-Gruppe am Tag 1. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung Die weißen Pfeile zeigen auf glatte Muskelzellen, passen aber auch zu Fibroblasten; weißer Balken: jeweils 100 µm.
- Abb. 27:** Venensegment aus der KHP-Gruppe am Tag 10. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung Gegenüber der Abb. 31 läßt sich eine deutliche Zunahme der Rotfluoreszenz (= nekrotische Zellen) beobachten weißer Balken: jeweils 100 µm.
- Abb. 28:** Endothelzellschicht, 40fache Vergrößerung. Dicker weißer Pfeil zeigt auf eine PI-positive Endothelzelle, schlanke Pfeile zeigen auf PI-positive Myozyten.
- Abb. 29:** Venensegment aus der UW-Gruppe am Tag 1. Die Ausgangsqualität schien eingangs etwas klarer und physiologischer als bei der KHP-Gruppe. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung ; weißer Balken: jeweils 100 µm.
- Abb. 30:** Venensegment aus der UW-Gruppe am Tag 10. Detail in 40facher Vergrößerung. Grün-fluoreszierende vitale Zellen vs. rot fluoreszierende, apoptotische Zellen.

*Dicker weißer Pfeil zeigt auf eine PI-positive Endothelzelle, schlanke Pfeile zeigen auf PI-positive Myozyten; weißer Balken: 100 µm.*

**Abb. 31:** *Venensegment aus der TiPROTEC-Gruppe am Tag 1. Detail in 40facher Vergrößerung; weißer Balken: 100 µm 10fache Vergrößerung, 1.Tag. TiPROTEC-Konservierung.*

**Abb. 32:** *Venensegment aus der TiPROTEC-Gruppe am Tag 10. Es zeigten sich nur wenige PI-gefärbte Zellen. Im Unterschied zu den beiden anderen Konservierungslösungen blieben die grün-fluorezierenden Zellen in Ihrer Struktur erhalten. Detail in 40facher Vergrößerung; weißer Balken: 100 µm 10fache Vergrößerung, 1.Tag. TiPROTEC-Konservierung*

**Abb. 33:** *Strukturformeln Histidin und N-Acetylhistidin, entnommen Wille et al, 2008.*

**Abb. 34:** *Strukturformel der beiden Eisenchelatoren in der TiPROTEC-Lösung. Die chelatisierenden Hydraxaminsäuregruppen sind rot markiert. (entnommen: Wille et al, 2008).*

**Abb. 35:** *Wandaufbau von Vene und Arterie (entnommen Fox, Stuart I., Human Physiologie 4th ed, WC Brown Publishers, US).*

**Abb. 36:**  *$\alpha_1$ -Rezeptor und die Signaltransduktion intrazellulär. Entnommen aus Aktories et al, Pharmakologie und Toxikologie, 9.A. © Elsevier GmbH, S. 174 - 178. PI-PLC: phosphatidylinositspezifischen Phospholipase C, PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat.*

### III. Tabellen

**Tab. 1:** Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

**Tab. 2:** Zusammensetzung der ViaSpan-Lösung, Bristol-Myers Squibb, Stand 2007.

**Tab. 3:** Bestandteile der TiPROTEC®-Lösung.

**Tab. 4:** Venenanzahl, Gegenüberstellung der insgesamt eingangs getesteten Venen und der nach dem ersten Test übriggebliebenen, in die Studie eingegangenen Venen. Verteilung der Diabetiker und Nicht-Diabetiker.

**Tab. 5:** KCl erzeugte, Rezeptor-unabhängig Kontraktion der KHP-Gruppe. Aufgeführt sind die Medianwerte ( $\pm$  Standardabweichung) für  $n = 9$ .

**Tab. 6:** KCl erzeugte, Rezeptor-unabhängig Kontraktion der UW-Gruppe. Aufgeführt sind die Medianwerte ( $\pm$  Standardabweichung) für  $n = 11$ .

**Tab. 7:** KCl erzeugte, Rezeptor-unabhängig Kontraktion der TiPROTEC-Gruppe. Aufgeführt sind die Medianwerte ( $\pm$  Standardabweichung) für  $n = 12$ .

**Tab. 8:** KCl-Test im Vergleich zwischen dem ersten und letzten Test

**Tab. 9:** Vasokonstriktion durch  $30 \mu\text{M}$  Phenylephrin in der KHL-Gruppe. Die Werte der Kontrollvenen wurden zum Verdeutlichen angegeben.

**Tab. 10:** Vasokonstriktion durch  $30 \mu\text{M}$  Phenylephrin in der UW-Gruppe.

**Tab. 11:** Vasokonstriktion durch  $30 \mu\text{M}$  Phenylephrin bei der TiPROTEC-Gruppe.

**Tab. 12:** Abweichung von  $t_1$  zu  $t_4$  für den Phenylephrin-Test mit SD und Signifikant.

**Tab. 13:** Mittelwert und SD-Tabelle für die Reaktion auf ACh.

**Tab. 14:** UW-Mittelwert und SD-Tabelle für die kompletten Datensätze.

**Tab. 15:** Mittelwerte und SD der TiPROTEC Venen.

**Tab. 16:** Relaxation, Differenz von  $t_1$  nach  $t_4$  mit SD und Signifikanz.

**Tab. 17:** KHP-Gruppe über die Zeit in der prozentualen Relaxation  $\pm$  SD.

**Tab. 18:** Relaxation in Prozent von K2 in der UW-Gruppe.

**Tab. 19:** Prozentuale Relaxation in der TiPROTEC®-Gruppe.

**Tab. 20:** T-Testung von  $t_1$  zu  $t_4$ , Mittelwerte und SD, Signifikanz.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Geschichte der Vena saphena magna Transplantation**

Autologe Transplantationen der Vena saphena magna (VSM) werden seit dem ersten Femoro-poplitealen Venenbypass 1948 durch Jean Kunlin weltweit zur Gefäßrekonstruktion durchgeführt. Der Einsatz der VSM ist mannigfaltig: z.B. als Patch nach Thrombarterektomie, zur Rekonstruktion nach Nierenarterienstenosen, bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder beim Aorto-koronar-venösen-Bypass zur Umgehung eines stenosierten Gefäßes.

Die VSM ist in vielerlei Hinsicht ein hervorragendes Ersatzmaterial für Umgehungen unzureichender Gefäßstrecken. Durch ihren epifaszialen Verlauf ist sie leicht zugänglich und vermindert Komplikationen, die durch tiefe Eingriffe entstehen könnten. Zusätzlich kommt es durch die Kollateralisierung und das zusätzliche tiefe Beinvenensystem zu wenig hämodynamischen und funktionellen Einbußen. Letztlich sind Eingriffe an den Beinen auch für den Patienten mit relativ wenig Komplikationen und einer ungestörteren Wundheilung verbunden, und dem Chirurgen steht eine lange Gefäßstrecke zur Verfügung.

Für die Konfrontation mit einer radikalen Druckumstellung und einem erhöhten dem 'shear-stress' sollte die Vene gesund und suffizient sein (Dobrin et al, 1989, Okadome et al, 1990, Kleinstreuer et al, 2001).

Diese Forderung ist nicht immer zu erfüllen, und daher ist der Einsatz der körpereigenen VSM zum Teil nicht möglich. Gründe hierfür sind Diabetes mellitus, postthrombotisches Syndrom, Varikosis, Phlebitiden oder inadäquater Durchmesser. Auch bei Bypassrevisionen oder erneuter Notwendigkeit weiterer Bypässe, wird körpereigenes Material knapp.

Allogene Venentransplantationen stellen eine Alternative zur Amputation bei chronischer Ischämie der Extremitäten dar. Balzer (2006) berichtet Erfolge bei der Rekonstruktion kindlicher Nierenarterienstenosen, der Coarctatio aortae und in der Behandlung von pAVK Patienten ab Fontaine Stadium III/IV.

Allotransplantate können auch bei einer Infektion von Kunststoffprothesen, akutem Gefäßverschluss oder einer Gefäßruptur zum Einsatz kommen (Kieffer et al, 2004). Hier ist innerhalb weniger Stunden der Ersatz und die Verfügbarkeit funktions-tüchtiger Gefäßtransplantate erforderlich.

Der Bedarf an Gefäßtransplantationen, wurde für 2007 Deutschland-weit auf 500 Transplantate geschätzt. Innerhalb des Netzwerkes der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) konnten 163 Blutgefäße gespendet und 101 transplantiert werden. Gegenüber 2003 (75 Spenden, 14 Transplantationen) nahm damit der Trend deutlich zu (Jesse, 2008).

Allogene Venentransplantate stellen eine etablierte Möglichkeit dar, Menschen mit unverwendbarem körpereigenem Material zu versorgen. Lange Zeit wurde von einem bradytrophem Gewebe ausgegangen und auf die Immunsuppression verzichtet. Dieses Vorgehen führte zu katastrophalen Reokklusionsraten. Mittlerweile ist aber klar, dass auch bradytrophes Gewebe einer Immunsuppression bedarf (Reinhard, Sundmacher 1998). Mit Cyclosporinen und kurzzeitig verabreichten Steroiden und einer suffizienten Antikoagulation (Luther 2004) lassen sich Abstoßungsraten niedrig halten. Parallel dazu begann die Suche nach einer geeigneten Konservierungsmethode, die niedrige Reokklusionsraten ermöglicht, einfach zu handhaben ist und überschaubare Kosten verursacht.

Bei adäquater Immunsuppression werden Offenheitsraten von bis zu 80 % nach 12 Monaten beschrieben (Azuma 1999). Retrospektive Untersuchungen zur Transplantation allogener Venen zur arteriellen Rekonstruktion und zur Hämodialyse zeigen eine 12-Monats-Offenheitsrate von 84 % bei vaskulärer Rekonstruktion und 46 % bei Shunt-Anlage (Suchý und Stádler, 1997).

Für die Konservierung und Präservierung wurden zahlreiche Methoden entwickelt, von denen sich jedoch keine zum verbindlichen Standard entwickelt hat. Ende der 80er Anfang der 90er Jahre begann man mit der Kryokonservierung allogener Transplantate, mit anfänglich ermutigenden Resultaten (Tice et al 1976). Spätere Studien zeigten eher ernüchternde Resultate: Gelbfish et al beobachteten nach 8-12 Tagen bereits eine Okklusionsrate von 26 %, Laub et al stellten angiographisch nach 7-12 Monaten eine Offenheitsrate von 41 % fest (bei autologer nicht-kryokonservierter Vene waren Offenheitsraten von 80 % nachzuweisen). Histologische Gutachten ergaben eine Veränderung kryokonservierter Venen, die sich in fibrotischen Degenerationen, Endothelnekrosen und Intimaablösungen darstellten (Boeken, 1993). Zezhao et al vermuteten eine Zerstörung durch Volumenexpansion bei der Auskristallisation in der Gefrierphase. In der Hälfte der Fälle kam es zum Wiederverschluss der Bypässe (Boeken 1993, Pascual, 2002).

Alternativ konnten autologes Blut oder Lösungen mit niedrigem Natriumgehalt die Venen zufrieden stellend erhalten (Langhammer, 1987)

Bas (2002) verglich mit funktionellen und histomorphologischen Untersuchungen die University of Wisconsin (UW) – Lösung mit der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung. Seine Ergebnisse zeigten eine Überlegenheit der UW-Lösung gegenüber der HTK-Lösung.

Mit denselben Untersuchungsmethoden wurde die Präservierung venöser Allotransplantate mit Eigenblut oder mit Ringer-Laktat-Lösung verglichen. Eigenblut stellte sich als geeigneteres Mittel heraus, wenn auch mit nicht allzu überzeugenden Ergebnissen (Saklak, 2004).

Bisher wird eine Gefäßprotektion in Konservierungslösungen bis max. 48 h empfohlen (Bas 2002). Das macht eine in den Europäischen Leitlinien und dem deutschen Gewebegesetz geforderte mikrobiologische Untersuchung von Transplantationsgewebe zeitlich unmöglich (Guidelines 2004 / 23 / EC; 2006 / 17 / EC, 'Gewebe-gesetz', AMWHV 2007). Die Anlage einer Deutschland-weiten Transplantationsbank für humane Gefäße ist somit zur Zeit nicht möglich.

## **1.2 Vene als Organmodell**

Es gibt mehrere Gründe für die Auswahl der VSM für die folgenden Untersuchungen: Jedes transplantierte Organ wird über dessen Gefäße in den Empfängerkreislauf integriert. Die Gefäße eines Transplantates sind für den Erhalt der Integrität eines Transplantates verantwortlich (He, Yang 1995). Ein Organ kann von hervorragender Qualität und absolut HLA-kompatibel sein. Wenn der vaskuläre Zu- oder Abfluss nicht intakt ist, muß aber mit einem Transplantatversagen gerechnet werden. Nach einigen Autoren kommt es durch eine vaskuläre Sklerose zu einem chronischen Transplantatversagen, die entscheidend von der prätransplantativen Gefäßqualität abhängt (Hayry et al, 1993; Orosz et al, 1997; Neil et al, 2002).

Die Vene lässt sich außerdem als einfaches Modell eines blutperfundierten, muskulären Hohlorgans sehen, bei dem das Endothel maßgeblich die Funktion beeinflusst. Ihre leichte Zugänglichkeit und das etablierte Präparations-Verfahren, schaffen gute Voraussetzungen für eine gute Vergleichbarkeit. Damit stellt die VSM ein geeignetes, kostengünstiges Modell zur Erforschung von Qualität und Interaktion

der Organkonservierungslösungen mit dem Transplantat dar. Um die klinische Übertragbarkeit zu gewährleisten, wurde diese Studie an humanen VSM durchgeführt,

### **1.3 Grundsätze der Organkonservierung**

#### **1.3.1 Hypothermie (4 °C): Schutz und Schädigung**

Das Cold Storage-Verfahren (CS) ist ein Standardverfahren zur Organkonservierung. Von der Durchtrennung der Blutzufuhr im Spender, über den Konservierungszeitraum bis zur Reimplantation im Empfänger befindet sich das Organ in Hypoxie. Durch das Kühlen des Organs laufen organische Prozesse langsamer ab. Die Schädigungen durch Hypoxie und Substratmangel werden reduziert. Die ATP-Depletion und die Anhäufung von Stoffwechselprodukten – und damit eine Übersäuerung – werden gedrosselt (Belzer und Southard 1988, Blankensteijn und Terpstra, 1991). Durch eine Lagerung zwischen 0 und 4 °C kommt es seltener als bei niedrigeren Temperaturen zur Kristallbildung im Gewebe (Erhard, 1998).

Es gibt zwei Verfahren zur hypothermen Konservierung. Meist wird das Organ mit kalter Konservierungslösung frei vom Blut des Spenders gespült und in einem sterilen Beutel von Konservierungslösung umgeben auf Eis gelagert. Dieses Verfahren ist universal verfügbar und leicht und schnell durchführbar. Das zweite Verfahren wurde von Belzer (1967) entwickelt. Hier erfolgt eine kontinuierliche hypotherme Perfusion mittels Pumpe. Damit ist das Verfahren technisch-, logistisch- und kostenaufwendig, bietet aber den Vorteil der Normoxie und des steten Substratangebotes (Stubenitsky et al, 2008).

Die Hypothermie selbst führt – wie mittlerweile bekannt ist – zu einer Schädigung des Organs: zu einer kälteinduzierten Apoptose. Bereits relativ früh wurde auch die kälteinduzierte Inhibition der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  beobachtet, die zu einer zellulären  $\text{Na}^+$ -Überladung und in der Folge zu einem  $\text{Cl}^-$ -Einstrom und zur Zellschwellung führt (Hochachka, 1986; Belzer und Southard, 1988; Blankensteijn und Terpstra, 1991). Interessant ist die Beobachtung, dass die Hypothermie allein nicht sondern die Hypoxie zum intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Anstieg führt (Fueckert et al, 2000).

Die kälteinduzierte Schädigung wird durch chelatisierbares, redox-aktives Eisen vermittelt und stellt wahrscheinlich den Dreh- und Angelpunkt der Kälteschädigung dar (Rauen et al, 1998, 1999, 2002). Der Anteil intrazellulärer Eisenionen am intrazellulären Eisen ist relativ klein. Sie lagern sich z.T. locker Proteinen und

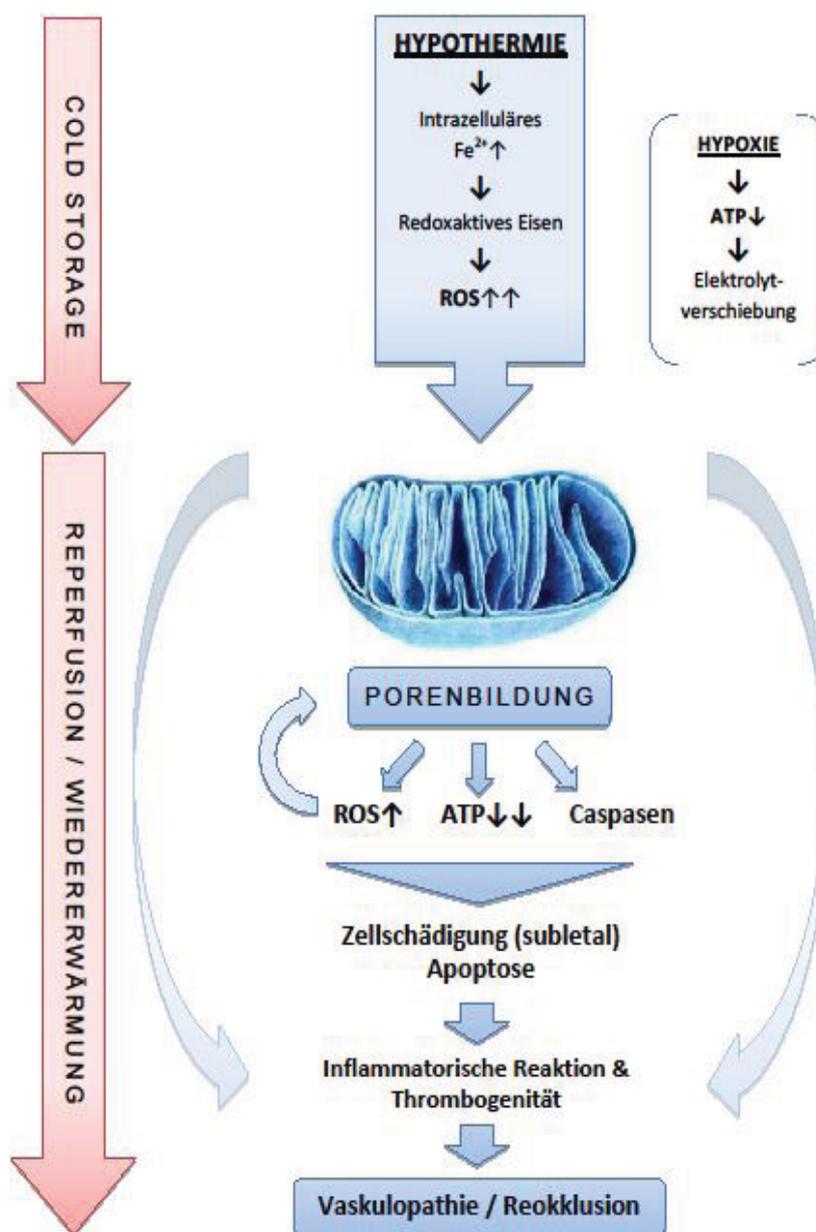
Lipiden an (Rauen et al, 2000). In physiologischem Zustand sind zytosolisch  $5,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$ , nukleär  $6,6 \pm 2,9 \mu\text{M}$  und mitochondrial  $12,2 \pm 4,9 \mu\text{M}$  chelatisierbares Eisen vorhanden (Petrat et al, 2001, 2002). In Kaltlagerung steigt dieser Pool rasch und führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die mit Membranlipiden, DNA und anderen intrazellulären Molekülen reagieren und damit – in Abhängigkeit der Dauer der Kälteinkubation – zur Zellschädigung führen (Rauen et al, 1999; Salahudeen et al, 2000). Dieser Schaden kann durch Zugabe von Eisenchelatoren, wie sie beispielsweise in der Therapie der Eisenspeicherkrankheit der Hämochromatose Verwendung finden, verhindert werden (Rauen et al, 2000, Rauen et al, 2003). Eine wichtige Rolle in der Zellschädigung ist auf eine Permeabilitätssteigerung der Mitochondrien (= mitochondrial permeability transition), zurückzuführen (Green und Reed 1998; Lemaster et al, 1999; Kerkweg et al, 2003). Durch den Einfluss vieler Faktoren wie z.B. intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS werden Poren geöffnet, die einen Austausch von Molekülen bis zu 1500 Da zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol erlauben (Zamzami und Kroemer, 2001). Das mitochondriale Membranpotenzial geht verloren. Zytosolisch durch anaerobe Glykolyse gebildetes ATP wird nun von mitochondrialen ATP-Synthasen gespalten, die auf Grund des fehlenden Membranpotenzials rückwärts als ATPasen funktionieren und so den ATP-Mangel verstärken. Auch proapoptotische Stoffe (Cytochrom C, Caspasen) gelangen nun vermehrt ins Zytosol und leiten den Zelltod ein (Green und Reed, 1998; Crompton, 2000; Desaugher und Martinou, 2000; Zamzami, Kroemer, 2001). Dieser Mechanismus findet während Hypoxie und Reoxygenierung verstärkt statt. Daher potenziert die Hypoxie die hypotherme Schädigung in großen Organen wie z.B. bei der Konservierung der Leber (Di Lisa et al, 2003).

Wird das Organ wieder mit Blut versorgt und erwärmt, potenziert dies den während der Kälteinkubation entstandenen Schaden (Salahudeen et al, 2001; Rauen et al, 2003). Auch hierbei spielt die eisenabhängige ROS-Formation eine ausschlaggebende Rolle (Rauen, 2000; Kerkweg, 2002). Die Schädigung in Hypothermie differiert zwischen unterschiedlichen Zelltypen, und gerade Endothelzellen reagieren sehr sensitiv auf diesen Mechanismus (Rauen et al, 2000; Schroeder et al, 2007). Trotz Evidenz der durch chelierbares Eisen induzierten Zellschädigung existieren kaum Organkonservierungslösungen, die diesem Mechanismus vorbeugen.

### 1.3.2 Konservierungslösungen

Einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Transplantats ist nach der chirurgische Entnahme den Konservierungslösungen zu zuschreiben.

Die führenden Konservierungslösungen wurden unter der klassischen Annahme entwickelt, die hypoxisch-hypotherme Schädigung beruhe hauptsächlich auf der Verschiebung der Ionenkonzentration und damit verbundener Zellschwellung. Deren Entwicklung zielte zum einen auf die Hemmung der Stoffwechselvorgänge und deren Einfluss auf die Ionenhomöostase und sollte zum anderen vor Übersäuerung schützen (Belzer et al, 1967, Collins et al, 1969, Bretschneider et al, 1988).



**Abb. 1:** Schema zum Entstehungsmechanismus der kälteinduzierten Schädigung. Während der Kaltlagerung (Cold storage) von Gefäßen kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die zur Porenbildung und zum Potenzialverlust der Mitochondrien beitragen. Die Hypoxie-Komponente spielt bei der Schädigung von Gefäßtransplantaten eine geringere Rolle, im Falle größerer Organe sind die Komponenten gleichgestellt. Wiedererwärmung führt zur Potenzierung der Schädigung. Die inflammatorische Reaktion und Thrombogenität sowie die dadurch entstehende Vasculopathie und Reokklusion treten nur in vivo auf. Details siehe Text.

Jeder Änderung der extrazellulären Ionenkonzentration folgt passiver und aktiver Ausgleich durch die Zelle. Letzteres verbraucht Energie. Es fallen Stoffwechselprodukte an, es kommt zum Sauerstoff- und Substratmangel. Letzteres beeinflusst die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , die durch fehlende Energiesubstrate das Membranpotenzial nicht mehr aufrecht halten kann (Kimzey, Willis 1971, Martin et al. 1972). Es kommt zur intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Akkumulation, zum  $\text{Cl}^-$ -Einstrom, dem passiv Wasser folgt. Es kommt zum intrazellulären Ödem und zum Zelluntergang, so die damalige Meinung (Martin 1972, Belzer et al 1988).

Um dem entgegen zu wirken, gibt es in Abhängigkeit ihres  $\text{K}^+$ -Gehalts zwei unterschiedliche Ansätze von Präservationslösungen: Lösungen mit einem hohen  $\text{K}^+$ -Gehalt, sogenannte intrazellulärer Zusammensetzung (UW = University of Wisconsin = Belzer; Euro-Collins-Lösung). Zu den Lösungen mit extrazellulärer Zusammensetzung gehören die HTK-Lösung und die Celsior-Lösung.

Beide Ansätze sind für unterschiedliche Einsatzgebiete prädestiniert. Entsprechend werden unterschiedliche Lösungen für die jeweiligen zu transplantierenden Organe verwendet.

Der Weltmarkt der Organkonservierungslösungen wird von der UW-Lösung (= Viaspan) und der HTK-Lösung (= Custodiol) mit einem gemeinsamen Marktanteil von 90 % dominiert. Es ist davon auszugehen, dass der globale Umsatz in den nächsten Jahren kontinuierlich ansteigt, da die Menschheit älter und Organversagen und damit der Transplantationsbedarf wahrscheinlicher wird (Jesse, 2008).

Bei den etablierten Konservierungslösungen wurde bisher die kälteinduzierte Schädigung nicht berücksichtigt (Abb. 1). Um diesem Aspekt gerecht zu werden, entwickelte man aus der in Europa häufig verwendeten HTK-Lösung über Zwischenstufen (Bahde et al, 2008) Custodiol-N zur Organkonservierung, insbesondere der Leber (Rauen et al, 2008). Mit seinem niedrigen  $\text{K}^+$ -Gehalt wurde HTK von Bretschneider primär als Kardioplegielösung entwickelt und ist seit 1988 klinisch zur Leberkonservierung im Gebrauch. Heutzutage wird die HTK-Lösung äquivalent zur UW-Lösung gesehen (Erhard et al, 1994; Canelo et al 2003; Pokorny et al, 2004). Für die neue Anwendung wurde eine Hauptkomponente der HTK-Lösung – das als Puffer dienende Histidin – teilweise durch *N*-Acetylhistidin ersetzt, da Histidin die Bildung eisenabhängiger hochreaktiver Sauerstoffspezies in vitro verstärkt (Rauen et al, 2007). Zur Prävention des  $\text{Na}^+$ -Einstromes bei Kaltlagerung wurde Glycin und das strukturverwandte Alanin zugesetzt (Rauen et al, 2008). Die

entscheidende Veränderung ist aber der Zusatz von zwei Eisenchelatoren, die das redox-aktive Eisen abfangen und damit den Ischämie/Reperfusionsschaden begrenzen (Rauen et al, 2008; Wille et al, 2008). Bei den Chelatoren handelt es sich um das hydrophile Desferal und das neusynthetisierte, lipophile Hydroxamsäurederivat LK 614 (Rauen et al, 2007).

Die Custadiol-*N*-Lösung ist mit einer hohen Pufferkapazität und einer moderaten Chelatorenkonzentration speziell für die Belange von Lebertransplantaten geeignet. Eine Custadiol-*N*-ähnliche Lösung wurde für die Herztransplantationschirurgie entwickelt. Hierbei ergaben sich aber durch die Chelatorzugabe keine Vorteile. Der Ersatz von Histidin durch N- $\alpha$ -Acetyl-L-Histidin ergab aber einen signifikanten Vorteil gegenüber der klassischen HTK-Lösung (Koch et al, 2010).

Aus der Custadiol-*N*-Lösung wurde die für die Gefäßprotektion zugeschnittene TiPROTEC<sup>®</sup>-Lösung entwickelt. Sie wurde bereits erfolgreich an Schweine-aortensegmenten (Wille et al, 2008), an Rattenmesenterialarterien und -aortensegmenten (Zatschler et al, 2009) und an der humanen Arteria mammaria interna (Garbe et al, 2010) getestet.

## 1.4 Endothelfunktion

Das Endothel – als Auskleidung des Gefäßsystems – stellt mit einer Gesamtoberfläche von 500 m<sup>2</sup> das größte Organ des Körpers dar. Seine Funktionen sind vielfältig: Es

- (1) stellt eine mechanische Barriere mit antithrombogener Oberfläche zur Regulation der Koagulation und Fibrinolyse dar,
- (2) hat eine immunologische Bedeutung,
- (3) spielt eine Rolle in akuten und chronischen Entzündungsprozessen,
- (4) regelt durch Rezeptoren und Signalkaskaden die Durchblutung (Furchgott, Vanhoutte 1989).

Auf vasoaktive Stoffe aus dem Blut oder von der basolateralen Seite reagiert das Endothel mit zellulären Veränderungen. Es kann selber Stoffe produzieren, die wiederum eine Antwort in der Media auslösen und damit die Wandspannung beeinflussen (Behrendt und Ganz, 2002). Als Diffusionsbarriere zwischen

Blut und Media reguliert das Endothel den Stoffaustausch mit der Umgebung und somit die Zusammensetzung des intra- und extravasalen Raumes.

Reaktionen des Gefäßsystems hängen von der Intaktheit des Endothels ab. Intaktes Endothel setzt kontinuierlich eine gewisse Menge Stickstoffmonoxid (NO) frei (Joannides et al, 1995; Anderson et al, 1995). NO, das seit geraumer Zeit im Blickpunkt des medizinischen Interesses steht, entsteht durch Abspaltung von L-Arginin mittels NO-Synthasen. Auslösende Reize sind körpereigene Substanzen wie Acetylcholin, Noradrenalin oder Scherkräfte des Blutes.

Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Adipositas, Dyslipidämie und der Nikotinabusus stellen die Hauptrisikofaktoren für Arteriosklerose und damit kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Gimbrone, Topper 1999). Diese Risikofaktoren haben ein gemeinsames Zielorgan: sie provozieren eine 'endotheliale Dysfunktion'.

Die normale Endothelfunktion ist dadurch gekennzeichnet, dass auf Acetylcholin-Gabe eine NO-Freisetzung stattfindet und zur Vasodilatation führt (Schipke et al, 1985). Bei der endothelialen Dysfunktion ist die Antwort auf NO vermindert. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden und vaso-konstringierenden Faktoren (Kojda, Harrison 1999). Ludmer et al (1986), beschrieben die segmentale Vasokonstriktion nach Acetylcholin-Infusion in humane, arteriosklerotische Koronararterien und wiesen damit eine 'endotheliale Dysfunktion' in einer klinischen Situation nach. Heute ist der Zusammenhang zwischen Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion gut etabliert.

Das Endothel reagiert sensitiv auf eine kälteinduzierte Schädigung (Rauen et al, 1999, 2000). In kultivierten Endothelzellen wurde eine von der Dauer der Kaltlagerung abhängige Veränderung festgestellt: In der Hypothermie kam es zu einem uncharakteristischen oder nekrotischen Zelluntergang, welcher bei der Wiedererwärmung verstärkt wurde und in einen apoptotischen Zelltod überging (Rauen, de Groot 2004, Rauen et al 2000, Rauen et al 1999, Schroeder et al 2007).

## **1.5 Ziel der Studie**

In dieser Arbeit ging es um den Vergleich eines gängigen Puffers (Krebs-Henseleit) mit einer etablierten Organkonservierungslösung (University of Wisconsin;

ViaSpan) und einer neuen Lösung (TiProtec), die neuere? Gesichtspunkte der Organkonservierung beachtet.

Die protektiven Möglichkeiten der drei Lösungen wurden auf zwei Ebenen untersucht: Entsprechend wurde eine Studie zur Funktionalität und eine Studie zur Vitalität von humanen Venenpräparaten durchgeführt. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Gibt es zeitabhängige Unterschiede in der Qualität der Gefäßprotektion zwischen den Versuchsgruppen?
- Wie entwickeln sich die kontraktile und dilatative Eigenschaften der drei Versuchsgruppen im Zeitverlauf?
- Lassen sich morphologische Veränderungen über die Zeit mit der konfokalen Mikroskopie erfassen?
- Gibt es morphologische Unterschiede zwischen den Konservierungsverfahren?
- Stimmen die morphologischen Ergebnisse mit den funktionellen Ergebnissen überein?

## 2. Materialien und Methoden

Die Venen stammten von Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf, die sich einer Aorto-Koronar-Venösen-Bypass-Operation (ACVB) unterzogen. Bei dieser Operation wurde ein Stück der Vena saphena magna (VSM) aus dem Bein entnommen. Die Venen wurden intraoperativ von kaudal nach kranial aus dem Bein präpariert. Perforansvenen und Abgänge wurden durch Ligaturen verschlossen. Die Suffizienz und Prüfung etwaiger undichter Stellen wurde mittels physiologischer Kochsalzlösung überprüft.

Abhängig von der Länge des zu erstellenden Bypasses wird nicht das gesamte entnommene Venenmaterial verwendet. Die anfallenden Reststücke wurden bis OP-Ende in physiologischer Kochsalzlösung gelagert und standen dann für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung. Die Patienten waren über die Verwendung der Restvenen für Versuchszwecke informiert. Die Einwilligung wurde schriftlich eingeholt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität hatte den Untersuchungen zugestimmt.

Die relevanten Patientendaten wurden mit Hilfe von standardisierten Auswertungsbögen erfasst. Zu den Daten gehörten Vorerkrankungen, Risikofaktoren, Medikamente, aktuelle Erkrankungen und demoskopische Größen wie Alter, Geschlecht, Gewicht und Größe (s. Anhang 1). Die Dokumentation und Archivierung der Patientendaten diente dem späteren Abgleich mit den Versuchsergebnissen. Vorab wurden keine Ausschlusskriterien festgelegt. Allein die Gefäßreaktion im ersten Test entschied über Aus- und Einschluss.

Der Einfluss der unterschiedlichen Konservierungslösungen und die Prä-servation des Gewebes wurden auf zwei Ebenen untersucht. Zum einen wurde die erhaltene Funktionsfähigkeit der Venen im Sinne der Vasomotion mit Hilfe isolierter Organbäder untersucht. Zum anderen wurde der Erhalt der Vitalität der Endothelzellen bildmorphologisch mit Hilfe der Lasermikroskopie untersucht.

## 2.1 Untersuchungen zur Funktion

### 2.1.1 Versuchsapparatur

Die Funktionalität der Gefäße wurde über das Kontraktions- und Dilatationsverhalten untersucht. Alle Funktionstests wurden an einer Apparatur für isolierte Organbäder durchgeführt (Abb. 2).



**Abb. 2:** Die Versuchsapparatur verfügte über je vier Organbäder. Der funktionelle Zustand der untersuchten Venenringe wurde über die entsprechenden Kraftaufnehmer untersucht.

Die Venenringe wurden in 10 ml fassenden, durchsichtigen Organbädern aus Duranglas (Abb. 3) aufgespannt. Dort wurden sie von täglich frisch angesetztem KH-Puffer umspült. Jedes Organbad war von einem doppelwandigen, flüssigkeitsgefüllten Glasbehälter umgeben. Mit einem Thermostat (Fa. Föhr, Medical Instruments GmbH, D-64342 Seeheim-Ober Beerbach, DE) wurde eine konstante Temperatur von 37,0 °C gewährleistet. Der KH-Puffer wurde ständig über Titanfritten, die für ein feinblasiges Ausströmen sorgten, mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Damit war für die Vene ein oxidativer Metabolismus möglich. Gleichzeitig war so ein optimales pH-Milieu von 7,4 gewährleistet.

Die Organbäder ließen sich einzeln mit einer Mikroprozessor-gesteuerten Pumpe mit KH-Puffer aus einem Vorratsbehälter füllen oder mit einer Vakuumpumpe leeren.



**Abb. 3:** Für die Messungen standen jeweils vier Organbäder mit einem Füllungsvolumen von 10 ml zur Verfügung (Details s. Text).

Für die Kraftmessung wurden die einzelnen Ringe zwischen zwei übereinander angebrachte, triangelförmige Haken eingespannt (Abb. 3). Der untere Haken war Bestandteil des Stativs. Der obere Haken war über einen Steg mit einem Kraftaufnehmer (TIM-1020 Transducer, Fa. Föhr, Medical Instruments GmbH, D-64342 Seeheim-Ober Beerbach, DE) verbunden. Das elektrische Signal wurde verstärkt und mit einem Biosignal-Analysesystem (Chart DATA, Fa. ADInstruments GmbH, D-74937 Spechbach, DE) auf einem Personal-Computer synchron registriert und gespeichert.

### **2.1.2 Präparation der Venen**

Um die Venen möglichst wenig zu beschädigen, erfolgte die Präparation in einer mit KH-Puffer (Tab. 1) gefüllten, gekühlten Petrischale. Auf einer Gummiunterlage wurden vier 4 mm breite Venensegmente mit einem Skalpell von der Restvene abgetrennt. Umliegendes Gewebe wurde abpräpariert. Bei der gesamten Präparation

wurde besonders darauf geachtet, dass das Endothel nicht geschädigt wurde. Bei der Präparation erwies sich das Vorhandensein des nahe angrenzenden Adventitia-Gewebes positiv für den Zustand der Gefäße, da die Vasa privata der Vene unangetastet bleiben.

**Tab. 1.** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers (KH-Puffer)

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
Na <sup>+</sup>	143,07
K <sup>+</sup>	5,87
Ca <sup>2+</sup>	1,60
Mg <sup>2+</sup>	1,18
Cl <sup>-</sup>	125,96
HCO <sup>3-</sup>	25,00
H <sub>2</sub> PO <sup>4</sup>	1,18
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,18
Glukose	5,05

Um einen Liter KH-Puffer anzumischen benötigt man:

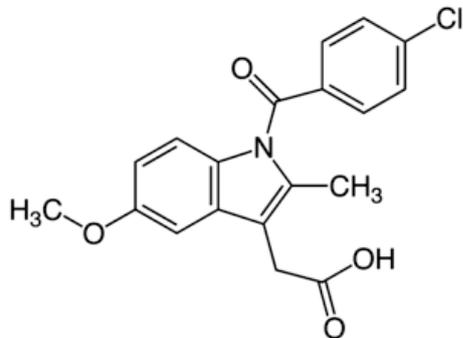
NaCl	6,9 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,1 g
Glukose	1,1 g

Dazu wurden jeweils 5,0 ml der Stammlösungen hinzugefügt:

Stammlösung 1	KH <sub>2</sub> PO <sup>4</sup>	0,235 mol/l
Stammlösung 2	KCl	0,939 mol/l
Stammlösung 3	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,235 mol/l
Stammlösung 4	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,320 mol/l

In einem Messkolben füllte man mit Aquabidest zu einem Liter auf. 5.36 mg des lipophilen Indometacin (Abb. 4) wurden in 1500 µl Ethanol gelöst, um eine 10 µM Indometacin-Konzentration im KH-Puffer zu schaffen. Dieses Essigsäurederivat gehört zu den NSAID's und vermindert durch Hemmung der

Cyclooxygenase die Prostaglandinsynthese. Da Prostaglandine eine komplexe Wirkung auf glatte Gefäßmuskulatur besitzen, wurde durch Gabe eines Cyclooxygenase-Inhibitors eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse ausgeschlossen.



**Abb. 4:** Strukturformel von Indometacin, einem aromatischen Essigsäurederivat

Quelle: Wikipedia

Titriert wurde bei 37,0 °C mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,2 (Krebs & Henseleit 1932, Sigma-Aldrich 2007). Der Grund hierfür ist die Anhebung des pH-Wertes durch die Carbogenbegasung auf einen physiologischen Wert von 7,4. Die Venen reagierten gegenüber pH-Schwankungen sehr empfindlich.

Täglich wurden 4 l des Puffers angesetzt. Die Stammlösungen wurden einmal im Monat ersetzt.

### 2.1.3 Versuchslösungen

Für die Konservierung wurden drei verschiedene Puffer / Lösungen eingesetzt: KH-Puffer (KHP), University Wisconsin-Lösung (UW) und die neue Lösung TiPROTEC.

#### 2.1.3.1 KHP-Gruppe

Um einen Ausgangswert zu erhalten, wurden Venen in KH-Puffer konserviert. In diesem Puffer fanden ebenfalls die Präparation und die Testung statt (Zusammensetzung s. Tab. 1).

#### 2.1.3.2 UW-Gruppe

Die Zusammensetzung der Grundlösung zur Organkonservierung der Fa. ViaSpan für die hypotherme Bel UW Aufbewahrungslösung ist in Tab. 2 zusammengestellt:

**Tab. 2:** Zusammensetzung der ViaSpan-Lösung, Bristol-Myers Squibb, Stand 2007.

<b>Bestandteil</b>	<b>g/l</b>	<b>Eigenschaft</b>
Poly(O-2- hydroxyethyl)stärke	50,0	Kolloid
Lactobionsäure	35,83	Impermeabel; unterdrückt hypothermischen Zellschwellung
Kaliumhydroxid-Lösung 56 %	14,5	Aufrechterhaltung der intrazellulären Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Konzentration
Natriumhydroxid-Lösung 40 %	3,679	Aufrechterhaltung der intrazellulären Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Konzentration
Adenosin	1,34	Bildung von ATP
Allopurinol	0,136	hemmt Xantinoxidase → Sauerstoffradikalbildung reduziert
Kaliumdihydrogenphosphat	3,4	pH-Puffer; ATP-Bildung
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	1,23	Aufrechterhaltung der zellulären Ionen Konzentration
Raffinose x 5 H <sub>2</sub> O	17,83	Impermeabel; unterdrückt hypothermischen Zellschwellung
Glutathion	0,922	Antioxidans; ATP-Bildung

Die Lösung hat etwa 320 mOsm/l mit einer Na<sup>+</sup>-Konzentration von 29 mEq/l und einer K<sup>+</sup>-Konzentration von 125 mEq/l (in Anlehnung an die intrazelluläre Ionenkonzentration). Bei Raumtemperatur beträgt der pH-Wert 7,4. Die Lösung ist klar, farblos bis gelblich und wird zur Organaufbewahrung unter aseptischen Bedingungen mit nachfolgenden Substanzen versetzt:

- 16 mg Dexamethason,
- 40 I.E. Normalinsulin,
- 200.000 IE Penicillin G.

Als Anwendungsgebiet wird die Aufbewahrung von Niere, Leber und Pankreas angegeben. Zur kontinuierlichen, maschinellen Perfusion ist die UW-Lösung nicht geeignet (Herstellerinformation: Bristol-Myers Squibb, Pharmaceuticals 2005).

Die Lösung ist relativ viskos (4,8 cP oder mPa s bei 4 °C), im Vergleich zu anderen Lösungen im gleichen Anwendungsgebiet, wie z.B. Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider. Die Viskosität ist vor allem durch die

Hydroxyethylstärke (HES) bedingt (Sumimoto et al, 1991, Tojimbara et al, 1997, van der Plaats 2004). Dies macht ein schnelles Durchspülen (= flushen) des Transplantats unmöglich. Pienaar et al, (1990) schlugen daher eine Auswaschphase mit Ringer-Laktat vor. Laut Hardesty et al, ist dadurch aber eine homogenere Perfusion des Transplantates gewährleistet. Die hohe Viskosität, die intrazelluläre Zusammensetzung und die impermeablen Substanzen verhindern einen Ausgleich zwischen Lösung und Transplantat und dadurch eine Zellschwellung (Steininger et al, 1992). Antioxidantien und Energielieferanten sorgen für den Erhalt der zellulären Integrität und ermöglichen den Stoffwechsel (Belzer, Southard 1988). Allopurinol hemmt die Xanthinoxidase und damit die Produktion von ROS während der Reperfusion. Auch das Antioxidans Glutathion ist aus diesem Grund Lösungsbestandteil.

### 2.1.3.3 TiPROTEC-Gruppe

Als Ausgangslösung diente die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung nach Bretschneider (1988). Eine bewährte Lösung mit extrazellulärer Zusammensetzung, einer niedrigen Viskosität und Histidin als Puffersubstanz. Histidin hat einen pK im optimalen Bereich, geht aber nur wenig stabile Verbindungen mit redox-aktivem Eisen ein (Stabilitätskonstante 2:1 mit  $\text{Fe}^{2+}$ :  $\log \beta_2 = 10,43$ ) (Williams 1970, Rauen et al, 2007). Das Eisen bleibt weiterhin redox-aktiv und bewirkt eine Lipidperoxidation. Histidin wurde in der neuen Lösung durch das weniger toxische *N*-Acetylhistidin ersetzt, welches weniger zellulär aufgenommen wird, über einen ebenso optimalen pK verfügt, aber eine modifizierte Eisenaffinität und eine veränderte Redoxaktivität seiner Eisenkomplexe aufweist (Wu et al, 2011, Rauen et al, 2008).

Zur Prävention des  $\text{Na}^+$ -Einstroms bei Kaltlagerung wurde Glycin und das strukturverwandte Alanin zugesetzt (Rauen et al, 2008).

Die Optimierung der Elektrolytzusammensetzung und die Zugabe eines Chelators komplettieren die veränderte Lösung. Als Chelatoren zeigte sich die Kombination des wenig permeablen Deferoxamin (0,1 mM Desferal®) mit dem für die Zellmembran permeablen LK614 (20  $\mu\text{M}$ ) als besonders günstig (Wille et al, 2008). Auch an der perfekten Elektrolytzusammensetzung wurde gefeilt. In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch ein hoher  $\text{K}^+$ -Gehalt die Endothelzellen besser protegert als eine hohe  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Mit einem pharmazeutischen Unternehmen (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim) wurde die Gefäß-

protektionslösung TiPROTEC<sup>®</sup> entwickelt. Die klare Lösung kann über 12 Monate bei 2-6 °C gelagert werden

Die Lösung ist in 100 ml und 500 ml Infusionsbeuteln erhältlich. Vor der Infusion werden die mitgelieferten 3,7 ml bzw. 18,7 ml Glukoselösung hinzugefügt.

**Tab. 3:** TiPROTEC<sup>®</sup>-Lösung. 100 ml Lösung enthalten folgende Bestandteile

Menge (g)	Inhaltsstoffe	Konzentration (mmol)
0,085	Natriumchlorid	1,4
0,564	Kaliumchlorid	7,3
0,169	Magnesiumchlorid * 6 H <sub>2</sub> O	0,8
0,015	Dinatriumhydrogenphosphat	0,1
0,001	Calciumchlorid * 2 H <sub>2</sub> O	0,005
0,671	N-Acetylhistidin * H <sub>2</sub> O	3,0
0,042	Tryptophan	0,2
0,030	α-Ketoglutarensäure	0,2
0,069	Asparaginsäure	0,5
0,078	Glycin	1,0
0,046	Alanin	0,5
0,0053	Deferoxaminmesilat	0,0082
0,00035	3,4-Dimethoxy-N-methylbenzhydroxamsäure	0,0017
0,198	Glukose-Monohydrat	1,0

## 2.1.4 Protokoll

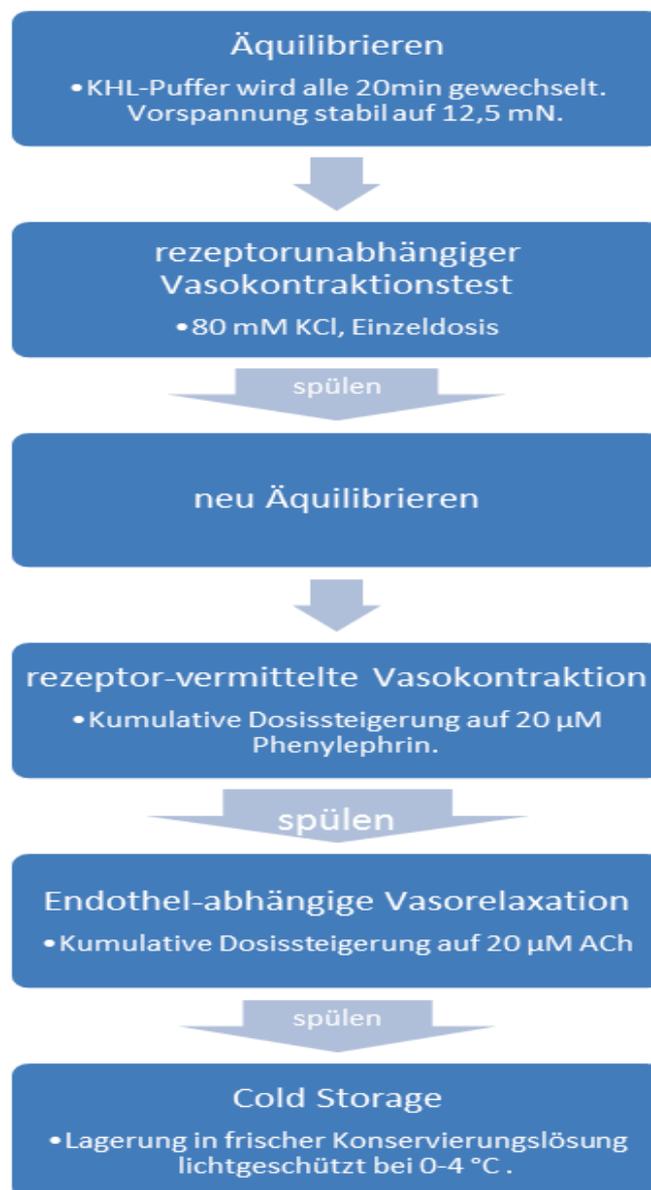
### 2.1.4.1 Kalibrierung

Vor jedem Versuch wurden die Kanäle der vier Organbäder neu eingestellt. Zunächst wurden die Aufspann-Triangeln ohne Gewicht eingehangen. Es folgte eine Software-unterstützte Nullpunkt-Kalibrierung (Chart 5.2.1; Power Lab; CA, US). Mit Kontrollgewichten mit einer Masse von 1 g wurde eine Spannung erzeugt, die am Transducer einer Kraft von 10 mN entsprach. Diese Kalibrierung wurde nach jedem Versuch wiederholt, um eine optimale Genauigkeit zu gewährleisten. Der weitere Protokollverlauf ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

### 2.1.4.2 Äquilibration

Es wurden jeweils mit großer Sorgfalt Venenringe der gleichen Breite hergestellt. Vor diesem Hintergrund wurde davon ausgegangen, daß die verwendeten Kräfte zu vergleichbaren Spannungen an den Ringen führten. Im Folgenden wird also nicht mehr zwischen Kraft und Spannung unterschieden, obwohl bekannt war, daß für Spannungsmessungen Querschnittsflächen bekannt sein müssen.

Die Vorspannung der Venen wurde auf  $12,5 \pm 0,4$  mN eingestellt. Die Zeit bis zum Erreichen einer stabilen Vorspannung über 3 min lag bei 20-40 min. Sofort danach wurde mit dem Versuch begonnen. Die Vorspannung wurde zwischen den einzelnen Versuchen einer Serie wiederholt neu adjustiert.



**Abb. 5:** Versuchsprotokoll, schematische Abfolge der einzelnen Versuchsschritte

### **2.1.5 Messung der Funktion**

Die Funktion der Venenringe wurde zu vier Zeitpunkten untersucht: nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h. Das Versuchsprotokoll bestand aus drei Funktionstests:

1. nicht Rezeptor-vermittelte Kontraktion mit KCl,
2. Rezeptor-vermittelte Kontraktion mit Phenylephrin,
3. Endothel-abhängige Relaxation mit Achetylcholin.

Die Funktion von vier Venensegmenten wurde gleichzeitig registriert. Der erste Test wurde auf allen Kanälen durchgeführt. Alle danach folgenden Tests wurden nur in drei der vier Organbäder durchgeführt. Das Verhalten der einzelnen Venen differierte von Spender zu Spender. Daher erwies es sich als Vorteil, das Verhalten eines Venensegments ohne die Einflüsse der Reagenzien als Kontroll- oder Vergleichswert aufzuzeichnen. Dabei wurde dasselbe Venenstück täglich zu jedem Versuchszeitpunkt auf dem gleichen Organbadkanal getestet. Nach den Funktionstests wurden die Venenringe in gekühlten, lichtundurchlässigen Eppendorf-Pipetiergefäßen mit frischer Konservierungslösung im Kühlschrank bei 4 °C bis zum nächsten Test im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **2.1.5.1 K1: nicht Rezeptor-vermittelte Kontraktion (mit KCl)**

Mit diesem Test wurde die Funktionsfähigkeit der Segmente überprüft. KCl depolarisiert die Membran und löst dadurch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aus (Karakı 1988, Perez et al, 2005). Nach dem Entleeren des Organbades wurden die Organbäder (1-4) mit 10 ml 80 mM KCl-Lösung gefüllt. Die Reaktion wurde solange aufgezeichnet, bis ein zur x-Achse asymptotischer Verlauf erreicht war. Dieser Wert fand als maximal erreichter Wert Eingang in die Statistik. Danach wurde dreimal gespült und geleert und anschließend erneut die Vorspannung auf  $12,5 \pm 0,4$  mN eingestellt. Konnte keine Reaktion im Sinne einer Kontraktion  $> 3$  mN ausgelöst werden, erfolgte der Ausschluss der Vene aus weiteren Tests.

### **2.1.5.2 K2: Rezeptor-vermittelte Kontraktion (mit Phenylephrin; PE)**

PE ist ein Sympathikomimetikum, welches über  $\alpha_1$ -Rezeptoren an den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Kontraktion führt. Getestet wurden drei Venensegmente, und ein Segment wurde erneut als Kontrolle mitgeführt und nicht mit PE versetzt. Nach der PE-Gabe wurde ein konstantes Spannungplateau abgewartet. Erst dann erfolgte ein erneuter PE-Versatz. Insgesamt wurden die Gefäßantworten auf sechs verschiedene, ansteigende Konzentrationen untersucht: 100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M. Die Zeit bis zum Erreichen einer konstanten Spannung variierte von Vene zu Vene. Die maximal erreichte Spannung wurde für alle Venensegmente durch 30  $\mu$ M PE erreicht. Dieser Wert ging in die Statistik ein. Nach der höchsten PE-Konzentration wurde das Bad dreimalig geleert und gespült.

### **2.1.5.3 Endothel-abhängige Relaxation (Acethylcholin; ACh)**

Aus der Maximalkontraktion durch PE wurde eine Vasorelaxation mit ACh ausgelöst. Die Zugabe erfolgte in sechs Schritten: 100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M. Erneut wurde nach dreimal gespült und geleert.

### **2.1.6 Konservierung und Lagerung**

Die Versuchsdauer hing von der Reaktionsgeschwindigkeit und dem Verhalten der Venen ab und betrug zwischen 1,5 – 4,0 h. Am Ende eines Versuches wurden die Venensegmente in gekennzeichnete, lichtgeschützte Eppendorf-Gefäße gegeben und bis zum nächsten Zeitpunkt bei 4 °C gelagert. In den Gefäßen befand sich die jeweilige Konservierungslösung. Bei dem folgenden Test wurden für jedes Segment dasselbe Organbad und damit dieselbe Messvorrichtung verwendet.

Nach dem Versuch wurden die alten Eppendorf-Behälter verworfen und neue, gekennzeichnete Behälter mit frischer Konservierungslösung zur Verwahrung der Venenstücke verwendet, um eine Kontamination auszuschließen.

### **2.1.7 Statistik**

Die Rohdaten wurden protokolliert und danach in einer Excel-Tabelle erfasst. Nach wiederholter Kontrolle durch drei unabhängige Personen wurden die

Daten in ein Auswertungsprogramm übertragen. Zur Auswertung wurde SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, US) in der Version 19 verwendet.

Neben den deskriptiven Auswertungen und den grafischen Darstellungen wurden die Hypothesen mit varianzanalytischen Verfahren geprüft. Diese Verfahren dienen dazu, die Auswirkung einer oder mehrerer gestufter unabhängiger Variablen (Faktoren) auf die abhängige Variable zu untersuchen. Das bedeutet in der vorliegenden Arbeit, dass der Einfluss der Faktoren 'Konservierungslösung' (3-stufig) und 'Zeit' (Messwiederholung, 4-stufig) auf die vier abhängigen Variablen (drei Kontraktions- und ein Relaxationsverhalten) geprüft wurde. Daraus ergibt sich ein 3 x 4-faktorieller Versuchsplan mit Messwiederholung für den Faktor 'Zeit'.

Bei der Anwendung von Varianzanalysen (ANOVA) zur Hypothesenprüfung müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst sollen die untersuchten Meßwerte normalverteilt sein. Diese Voraussetzung war erfüllt, die Prüfung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe zum Vergleich mit einer theoretischen Verteilung.

Eine zweite Bedingung ist die Homogenität der Varianzen. Diese Voraussetzung war in den vorliegenden Daten nicht uneingeschränkt erfüllt. Dieser Mangel ist aber zu tolerieren und kein Grund, bei der Beurteilung der Ergebnisse auf die Varianzanalyse zu verzichten, denn 'Verletzungen der Voraussetzungen führen im Fall hinreichend und gleich großer Stichprobenumfänge zu keinen gravierenden Entscheidungsfehlern' (Bortz, 1993).

Bei Varianzanalysen mit Messwiederholungsfaktoren ist eine weitere Grundannahme zu prüfen, die sogenannte Sphärizität: 'Die Bedingung der Sphärizität (Messwiederholungen) ist oft schwer erfüllbar. Die ANOVA kann trotzdem durchgeführt werden, für die Ergebnisse sollte allerdings eine Korrektur nach 'Greenhouse-Geisser' erfolgen (Rasch et al, 2006). Diesem Vorschlag folgend wird hier grundsätzlich der korrigierte, konservativere Wert verwendet.

Ergab die zweifaktorielle Berechnung Ergebnisse mit signifikanten Unterschieden, wurden die entsprechenden Faktoren mittels univariater Verfahren verglichen: einfaktorielle Varianzanalyse (Prozedur 'one-way' aus SPSS). Post-hoc-Tests zur Beschreibung homogener Untergruppen wurden nach Scheffé durchgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, weil es konservative Ergebnisse liefert und

als robust gegenüber möglichen Verletzungen der Grundvoraussetzungen gilt (Zöfel, 2001). Zum Vergleich der Veränderungen zwischen den zeitlichen Eckwerten (t1 und t4) wurden t-Tests für verbundene Stichproben gerechnet.

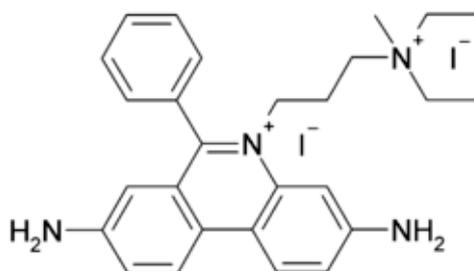
## 2.2 Untersuchungen zur Morphologie

Im Anschluss an die funktionelle Studie fand eine morphologische Begutachtung der Venen mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM510, Axiovert 100M, Fa. Zeiss, Jena, DE) statt. Die Begutachtung und Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Volker Stoldt (Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Ziel dieses zweiten Studienteiles war die bildmorphologische Analyse der Zellvitalität vs. Zelltod des Endothels und der Muskularis über einen 10 tägigen Zeitraum. Dazu wurde die Anzahl lebender und toter Zellen miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte an Tag 1 und an Tag 10.

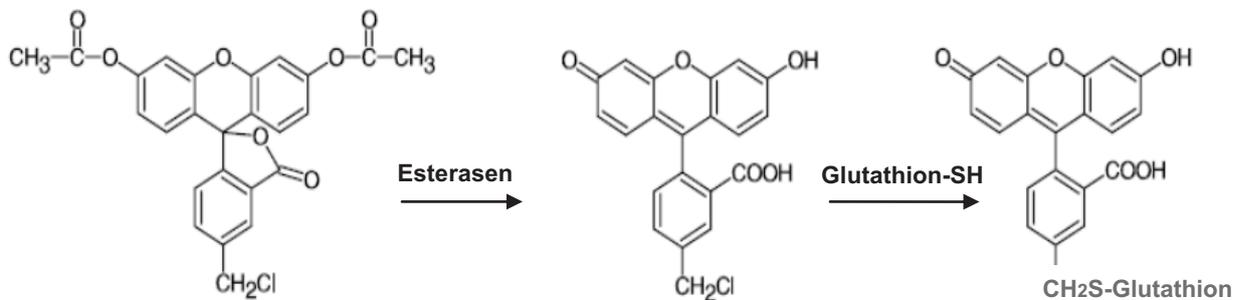
Die Färbung einer kompletten Vene, so daß ohne zu viele Artefakte durch gefangene Farbstoffe unterschiedliche Zellschichten übereinander angefärbt werden und dennoch erkennbar bleiben, erwies sich als diffizile Aufgabe.

Als zuverlässigste und sensibelste Marker stellten sich für nekrotische Zellen Propidiumiodid (PI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) (Abb. 6) und für lebende Zellen CMFDA (CellTracker™ Green 5-chloromethylfluoresceindiacetate (Fa. Invitrogen, Carlsbad, DE; Abb. 7) heraus. PI ist ein DNA-Interkalator, der nur bei beschädigter Zellmembran in die Zelle eindringen kann und an doppelsträngige DNA bindet. Er stellt, angeregt mit einem Argonlaser (Wellenlänge 488 nm), nekrotische Zellen mit einem Emissionsmaximum von 617 nm rot fluoreszierend dar.



**Abb. 6:** Propidiumiodid. Es handelt sich um ein nicht membrangängiges Molekül. Erst wenn sich mit dem Zelltod die Membranintegrität ändert, kann das geladene Molekül eindringen und mit der DNA interkalieren. Bei Bestrahlung mit dem Argonlaser wird nun eine Rotfluoreszenz sichtbar. *aus Wikipedia*

CMFDA wird durch intakte Zellmembranen transportiert und von intrazellulären Esterasen in das fluoreszierende 5-Chlormethylfluorescein umgewandelt und bindet an intrazelluläre Proteine. Mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, erstrahlen lebende Zellen grün.



**Abb. 7:** Intrazelluläre Umwandlung von CMFDA. Vor der enzymatischen ist CMFDA farblos und nicht fluoreszierend. Erst nach Abspaltung der Acetate mittels intrazellulärer Esterasen entwickelt sich die grünfluoreszenz. Durch die Reaktion der Chlormethylgruppe mit intrazellulärem Glutathion wird das grünfluoreszierende CMFDA membranimpermeabel, was ein Auswasches des Farbstoffs verhindert. *modifiziert nach: Invitrogen*

Zur Markierung der Zellen wurden verschiedene fluoreszierende Zellfarbstoffe (PI und CMFDA) und Antikörper (CD 141, CD 146, IgG1, VE-Cadherin, CD 31) verwendet. Da Ausbleichen (= Photobleachen) zu Minderung der Bildqualität und Aussagekraft führt, wurde mit einer geringen Laserintensität gearbeitet (< 20 % der max. Intensität). Ein Stück des Venenpräparates wurde jeweils ohne Färbung untersucht. Eine Eigenfluoreszenz des Gewebes war unter den validierten Geräteeinstellungen (Laserintensität und Verstärkung des Photomultipliers) nicht detektierbar.

Um die Versuchsergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurden die Einstellungen von Lochblende (= pinhole), Photomultiplier, Kontrast, Helligkeit und Laserintensität bei den einzelnen Versuchsreihen konstant gehalten.

### 2.2.1 Färbung und Aufbereitung der Venen

Die Venen wurden ebenso wie in der funktionellen Studie transportiert und gelagert, d.h. in der jeweiligen Konservierungslösung und bei 4 °C in lichtundurchlässigen Eppendorf-Gefäßen. Der Zuschnitt der Vene erfolgte bei Raumtemperatur in einer Petrischale auf ein Maß von 0.3 x 0.5 cm<sup>2</sup>. In Eppendorf-Gefäßen wurden die

Venenstücke mit 5  $\mu\text{l}$  CMFDA über 40 min bei Raumtemperatur in 50  $\mu\text{l}$  der Konservierungslösung inkubiert. In den letzten 10 min wurden 2,5  $\mu\text{l}$  PI-Lösung hinzugeben. Nach 3-maligem Waschen hat sich eine Ruhezeit von 40 min bei Raumtemperatur in der Konservierungslösung etabliert. Anschließend wurden die Venenpräparate vorsichtig auf dem Objektträger positioniert und mit den jeweiligen Konservierungslösungen als Schutz vor dem Austrocknen benetzt, um dann umgehend unter dem Lasermikroskop begutachtet zu werden (Abb. 8).



**Abb. 8:** Schematischer Versuchsablauf der Studie zur Vitalität.

### 2.2.2 Analyse

Die Venenzuschnitte wurden am Tag 1 und am Tag 10 der Konservierung untersucht. Unter 10-facher Vergrößerung erfolgte die Einschätzung zur Qualität der Färbung des Präparates. Danach wurden alle Abschnitte unter 40-facher Vergrößerung begutachtet und Zellschicht für Zellschicht in 7,5  $\mu\text{m}$  Abständen in die Tiefe untersucht, um das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in Endothel und Muskularis getrennt erfassen zu können. Mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM510, Zeiss, Jena, DE) wurden zu jeder Serie entsprechende Bilder erstellt. Auf diese Weise konnten die Zellen des Endothels getrennt von den Zellen der Muskularis ausgewertet werden. Als Maß für den Erhalt oder den Untergang der Zellen wurde die Veränderung der Fluoreszenz herangezogen. Zu jeder Konservierungslösung wurden 2 Exemplare aufgearbeitet. Der Massstab betrug in allen Abbildungen 100  $\mu\text{m}$ .

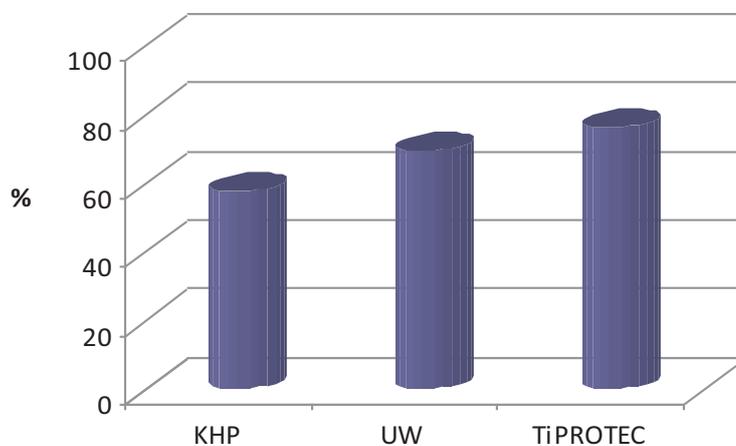
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Funktion

Alle untersuchten Venen wurden bei elektiven Bypass-Operationen entnommen und wie folgt drei Gruppen zugeteilt (Tab.4):

**Tab. 4:** Gegenüberstellung von den eingangs getesteten Venen mit den nach dem ersten Test verbliebenen und in die Studie eingegangenen Venen. Verteilung der Diabetiker und Nicht-Diabetiker.

Versuchsreihe	n-Zahl gesamt	n-Zahl nach Eingangstest	Diabetiker	Nicht- Diabetiker
KHP	26	15	6	9
UW	26	18	6	12
TiPROTEC®	25	19	7	12

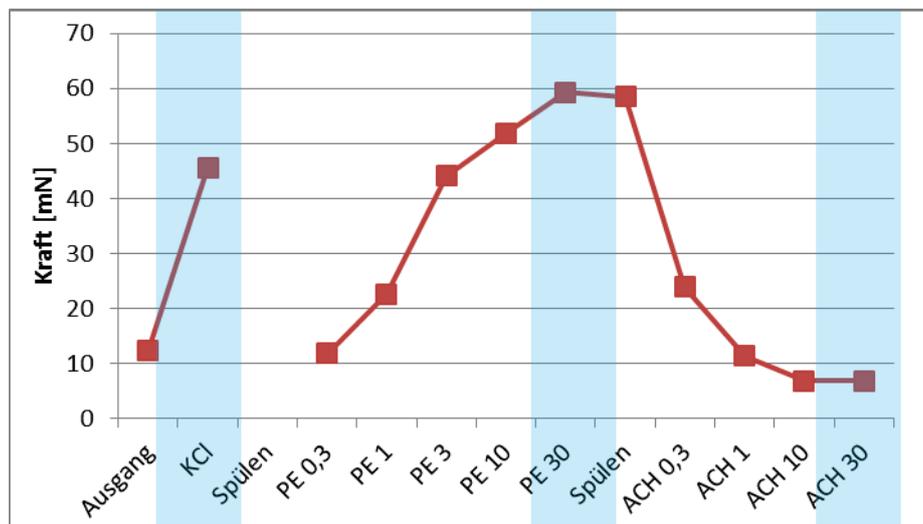


**Abb 9:** Anteil der getesteten Venen an der Gesamtzahl der Venen

Die Aufteilung erfolgte durch Randomisierung. Anders als bei Bas (2002) und Saklak (2004) wurden Diabetiker nicht ausgeschlossen. Das Ausschlusskriterium war eine fehlende Kontraktion, oder eine Kontraktion  $< 3$  mN im ersten Versuch. Der erste Test erfolgte immer nach 3 h in der jeweiligen Konservierungslösung. Die Gesamtzahl der Venen, die verbliebene Zahl der Venen und der Anteil der Venen von Diabetikern sind in Tab. 4 zusammengestellt. Hier zeigte sich bereits ein möglicher Einfluß der protektiven Lösungen (Abb. 9). So konnten nur 58 % der

Venen nach 3 h KHP-Konservierung für die weiteren Tests verwendet werden. Im Unterschied dazu eigneten sich 69 % der in UW-Lösung und 76 % der in der TiPROTEC-Lösung gelagerten Venen für die weiteren Untersuchungen zur Funktion.

In Abb. 10 ist zur Verdeutlichung noch einmal der Protokollablauf an Hand repräsentativer Messergebnisse dargestellt.



**Abb. 10:** Versuchsablauf für eine Beispielvene. Von der Ausgangsspannung von ca. 12,5 mN startet der KCl-Versuch. Nach erreichter Kontraktion wird gespült und neu äquilibriert. Danach startete die Phenylephrin-Gabe. Zuletzt wird ACh in aufsteigender Dosierung hinzu pipetiert. (Details s. Text).

### 3.1.1 K1: Rezeptor-unabhängig Kontraktion mit KCl

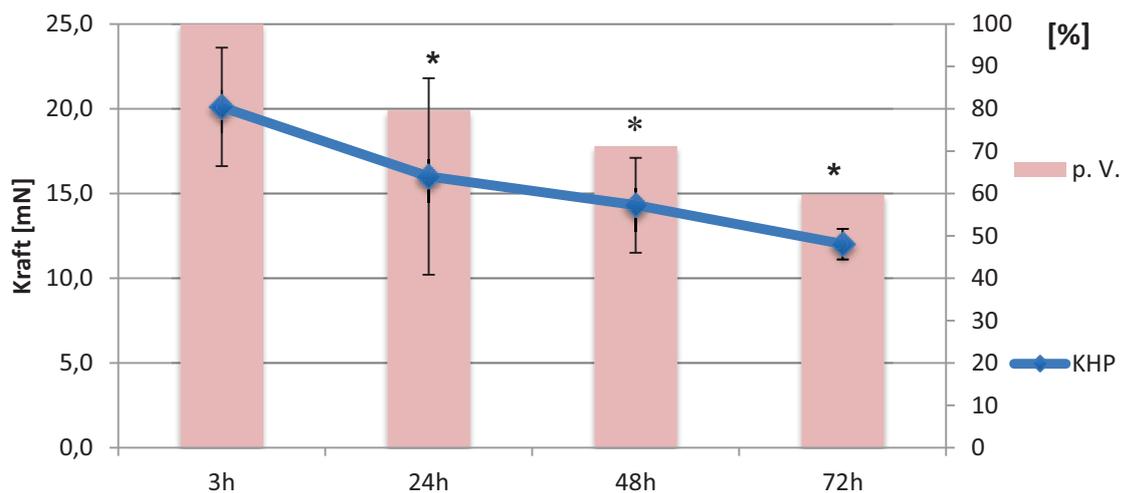
Der KCl-Test wurde verwendet, um die Qualität der in die Studie eingehenden Venen zu gewährleisten. Die Venen, bei denen kein Spannungsanstieg von  $\geq 3$  mN von der Baseline zu verzeichnen war, wurden von der weiteren Testung ausgeschlossen (11 Venen, s. Tab. 4).

#### 3.1.1.1 KHP-Gruppe

Mit einem gemittelten Kontraktionswert von  $20,1 \text{ mN} \pm 3,5 \text{ mN}$  war schon beim ersten Test ein signifikanter Unterschied gegenüber der TiPROTEC-Gruppe ( $p < 0,001$ ) aber nicht für die UW-Gruppe ( $p = 0,182$ ) zu erkennen.

**Tab. 5:** KHP-Gruppe. Rezeptor-unabhängig Kontraktion mit KCl.  
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 9$ .

KHP	Kontraktionskraft [mN]	SD
3 h	20,1	3,5
24 h	16,0	5,8
48 h	14,3	2,8
72 h	12,0	0,9



**Abb. 11:** Rezeptor-unabhängig Kontraktion. Aufgeführt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (blaue Linie) und die prozentualen Veränderungen (p.V.; rosa Säulen) vom Ausgangswert (= 100 %) zu vier verschiedenen Messzeitpunkten. \* $p < 0,05$  vs 3 h

In Abb. 11 wurden die Mittelwerte und die prozentualen Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert (= 100 %) dargestellt. Über die Zeit kam es zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft vom ersten zum zweiten Zeitpunkt, sowie vom dritten (= 48 h) zum vierten Zeitpunkt (= 72 h). Nach 72 h konnte durch KCl keine Kontraktion  $> 12 \text{ mN} \pm 0,9 \text{ mN}$  mehr ausgelöst werden. Die Standardabweichungen nahmen über die Zeit ab. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Venen in KHP-Konservierung im gleichen Maß schlechter wurden.

### 3.1.1.2 UW-Gruppe

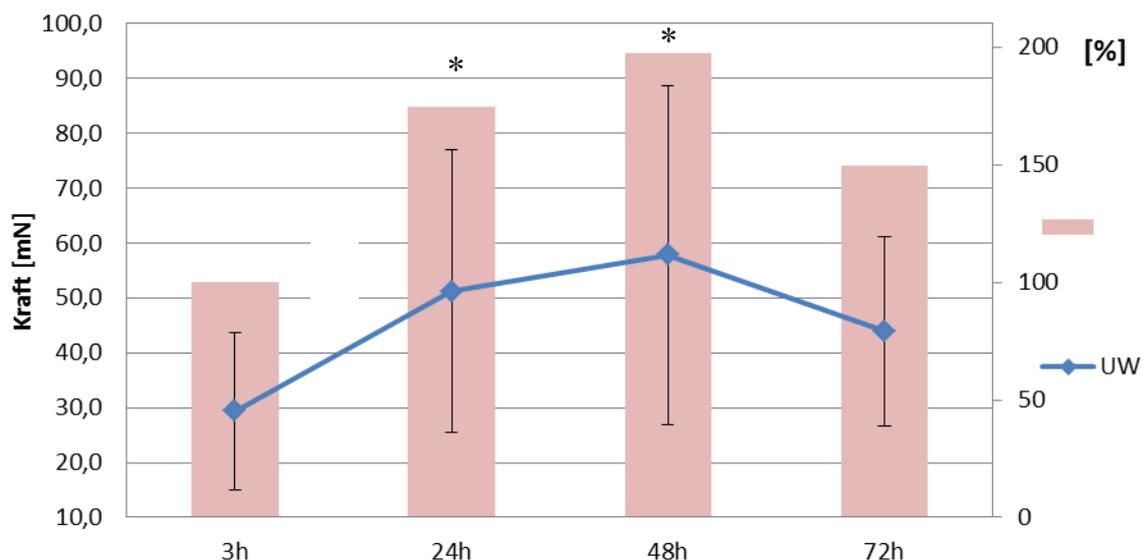
Die UW-Gruppe zeigte gegenüber der KHP-Gruppe eine nicht signifikant größere Anfangskontraktion (= 29,1 mN ± 7,3 mN). Nach 24 h stieg die Spannung auf 55,2 mN ± 31,0 mN ( $p = 0,001$ ) an. Nach 48 h stieg die Spannung weiter leicht an, um nach 72 h auf 43,9 mN ± 17,3 mN nicht signifikant ( $p = 0,074$ ) abzufallen (Abb. 12). Nach 24 h war die UW-Lösung dem KH-Puffer signifikant überlegen.

**Tab. 6:** KHP-Gruppe. Rezeptor-unabhängig Kontraktion mit KCl.

Mittelwerte ± Standardabweichung;  $n = 11$ .

KHP	Kontraktionskraft [mN]	SD
3 h	28,1	7,3
24 h	55,2	18,1
48 h	67,0	31,0
72 h	43,9	17,3

Gegenüber TiPROTEC erreichten die Gefäße der UW-Gruppe zum Zeitpunkt 72 h signifikant geringere Kontraktionskräfte.



**Abb. 12:** Rezeptor-unabhängig Kontraktion. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (blaue Linie) und die prozentualen Veränderungen (p.V; rosa Säulen) vom Ausgangswert (= 100 %) zu vier verschiedenen Messzeitpunkten. \* $p < 0,05$  vs 3 h

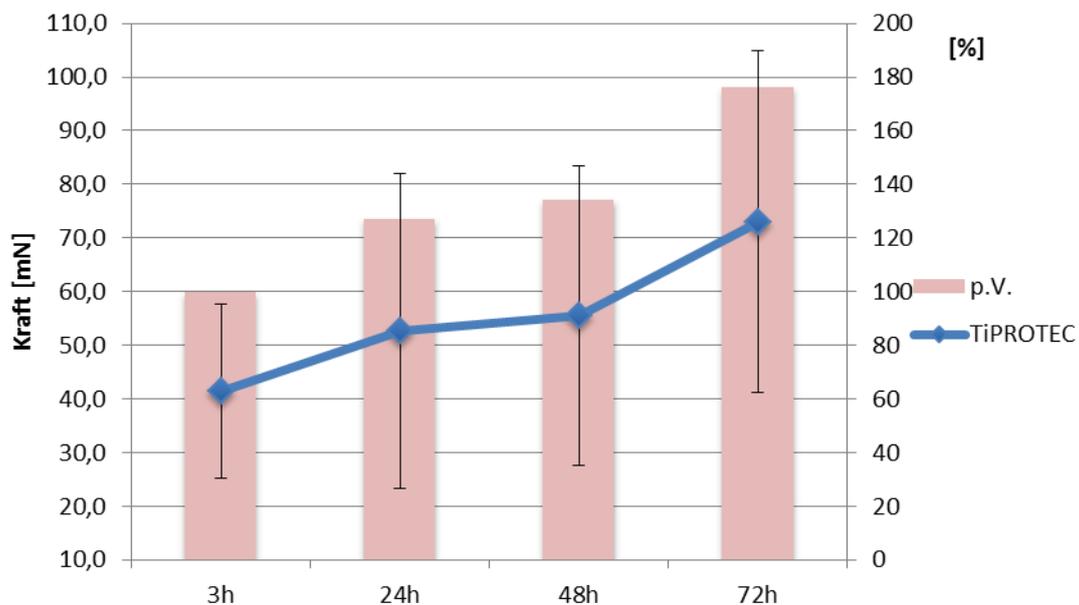
### 3.1.1.3 TiPROTEC- Gruppe

Bei den Venen dieser Gruppe wurde ein Anstieg der Kontraktionskraft von  $41,4 \text{ mN} \pm 16,2 \text{ mN}$  (= 3 h) auf  $73,0 \text{ mN} \pm 31,9 \text{ mN}$  (= 72 h) registriert (Tab. 7). Das entsprach einer Steigerung von 76 % vom Ausgangswert.

**Tab. 7:** KHP-Gruppe. Rezeptor-unabhängig Kontraktion mit KCl.  
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 12$

KHP	Kontraktionskraft [mN]	SD
3 h	41,4	16,2
24 h	52,6	29,3
48 h	55,5	28,0
72 h	73,0	31,9

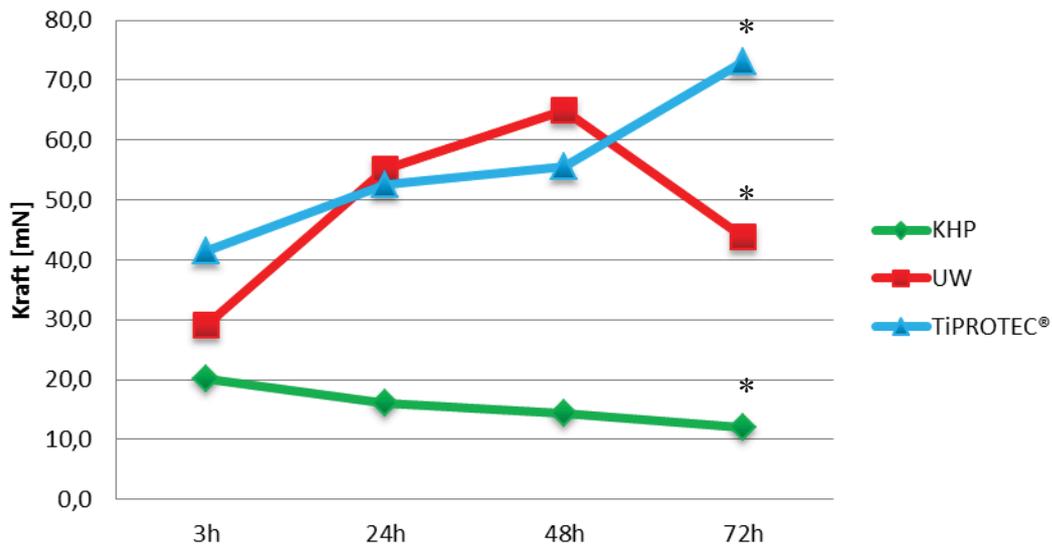
Bereits zum Zeitpunkt 3 h waren die Venen aus dieser Gruppe denen der KHP-Gruppe signifikant überlegen. Bei 72 h bestand eine signifikant größere Kontraktionskraft für die Venen aus der TiPROTEC-Gruppe gegenüber denen der KHP-Gruppe ( $p < 0,001$ ) und denen der UW-Gruppe ( $p = 0,01$ ). Zwischen 24 h und 48 h war der Anstieg der Kontraktionskraft nicht signifikant ( $p = 0,81$ ) (Abb. 13).



**Abb. 13:** Rezeptor-unabhängig Kontraktion. Aufgeführt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (blaue Linie) und die prozentualen Veränderungen (p.V.; rosa Säulen) vom Ausgangswert (= 100 %) zu vier verschiedenen Messzeitpunkten. \* $p < 0,05$  vs 3 h

### 3.1.1.4 K1: Vergleich der Konservierungslösungen

Besonders in der Gegenüberstellung der drei Gruppen (Abb. 14) wird die Qualität der Konservierung klar. Nach 72-h Lagerung im KH-Puffer war kein Kontraktionsvermögen > 12 mN mehr nachweisbar, hingegen wurde für die TiPROTEC-Lösung zu diesem Zeitpunkt die größte Kontraktionskraft erreicht.



**Abb. 14:** Zeitabhängiges Verhalten der Kontraktionskraft für die drei untersuchten Lösungen im KCl-Test. Die im KH-Puffer aufbewahrten Venen kontrahierten bereits zum Zeitpunkt 24 h signifikant schlechter als Venen in den beiden anderen Gruppen. \* $p < 0,05$  vs 3h

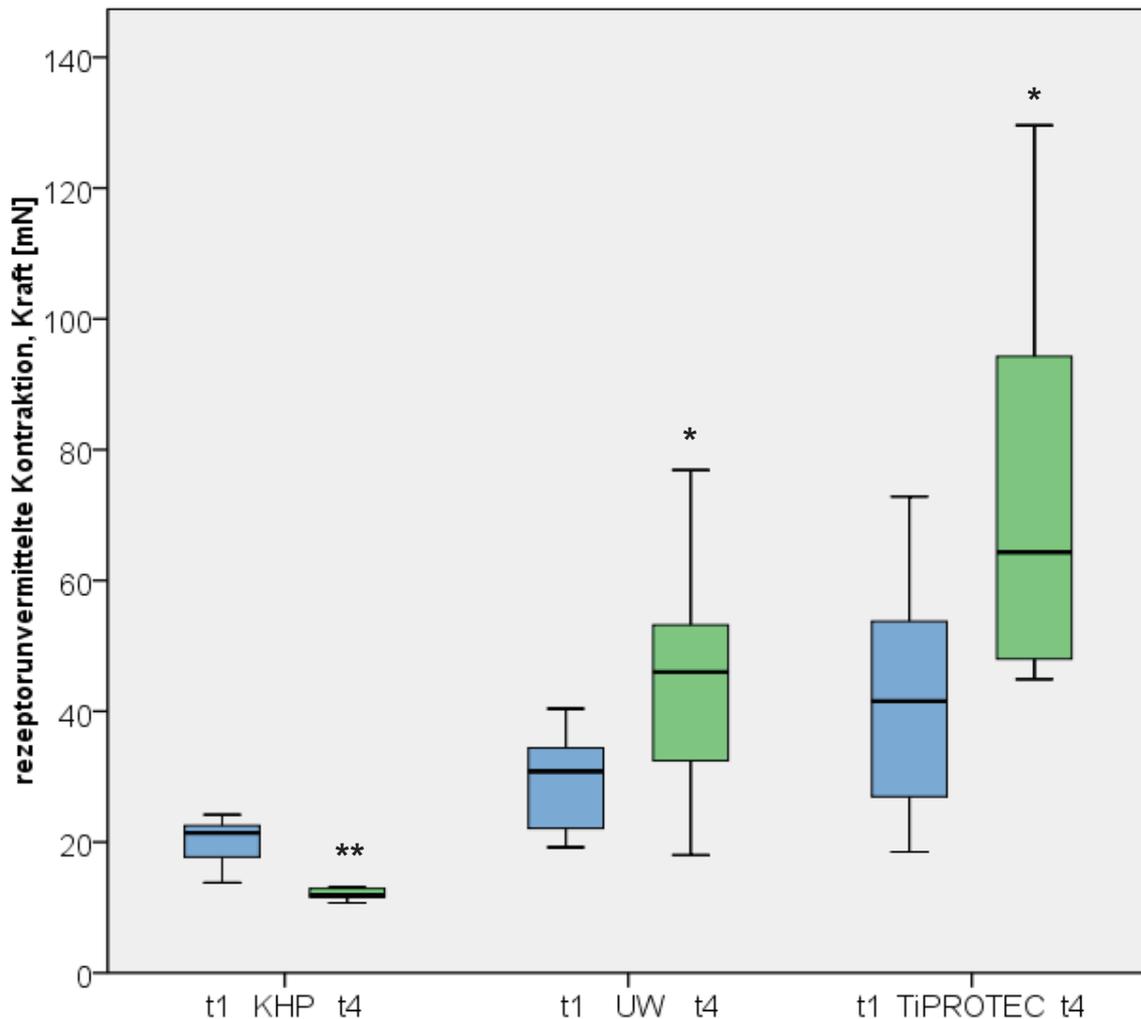
Zur Vereinfachung der statistischen Berechnungen (SPSS) wurden einige Variablen umbenannt und der Vergleich auf 3 h vs 72 h beschränkt.. So wurde aus dem Zeitpunkt 3 h t1, und aus dem Zeitpunkt 72 h wurde t4. Die entsprechenden Werte für t1 und t4 sind in Tab. 8 und in einem Boxplot (Abb. 15) präsentiert.

**Tab. 8:** KCl-Test im Vergleich zwischen dem ersten (=t1) und dem letzten (t4) Test

Gruppe	Kontraktionskraft; Differenz t1 - t4 [mN]	± SD	Signifikanz (2-seitig)
KHP	-8,10	3,19	,000
UW	14,82	17,65	,019
TiPROTEC	31,61	34,77	,009

Nach Tab. 8 fiel die Kontraktionskraft in der KHP-Gruppe signifikant ab, während sie in der UW- und TiPROTEC-Gruppe signifikant zunahm. Bemerkenswert war die Abnahme der Standardabweichung in der KHP-Gruppe.

### Kontraktion mit KCl (K1)



**Abb. 15:** Boxplot der Rezeptor-unabhängig Kontraktionskraft. Die Ergebnisse nach 3 h (t1) (= blau) und 72 h (t4) (= grün) Konservierung wurden gegenüber gestellt  $**p < 0,01$  vs t1;  $*p < 0,05$  vs t1.

Auch die Boxplot-Darstellung zeigt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten t1 und t4 für die drei Gruppen. Mit Hilfe des Boxplots lassen sich die Unterschiede detaillierter interpretieren. Zum Zeitpunkt t4 (= 72 h) hatten die Venen im KH-Puffer ihre Kontraktionskraft recht einheitlich eingebüßt. Bei der UW-Gruppe lagen die meisten Werte sowohl zum Zeitpunkt t1 als auch zum Zeitpunkt t4

im 1. Quartil bis zum Medianwert, also in der unteren Hälfte. Im Gegensatz dazu lag der überwiegende Anteil der TiPROTEC-Venen zum Zeitpunkt t1 gleichmäßig um den Median. Zum Zeitpunkt t4 (= 72 h) ist nicht nur eine 31,6 mN größere Kontraktionskraft nachweisbar, die Hauptmasse der in TiPROTEC-konservierten Venen liegt oberhalb des Median. Unterhalb des Median ist die Streuung nicht ganz so stark ausgeprägt.

Eine Wechselwirkung zwischen den drei Gruppen und den vier Zeitpunkten lässt sich bereits aus der Abb. 14 vermuten (Kontraktionskraft sinkt bei KHP, UW zeigte keine signifikante Veränderung, Kontraktionskraft steigt bei TiPROTEC). Entsprechend lieferte das varianzanalytische Modell mit Messwiederholung den Nachweis für eine signifikante Wechselwirkung ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.2 K2: Rezeptor-abhängige Kontraktion mit Phenylephrin (PE)**

In einer Dosis-Wirkungskurve wurde durch PE eine maximale,  $\alpha$ -Rezeptor-vermittelte Vasokonstriktion induziert. Die PE-Konzentration wurde kumulativ von 0,3  $\mu$ M auf 30  $\mu$ M gesteigert. Die Konzentrations-Wirkungskurve konnte in den eingeschlossenen Präparaten in vergleichbarer Weise bis zur Maximalkontraktion dargestellt werden. Dieser Test bezog sich nur auf 3 der 4 eingespannten Venen, weil eine Kontrollvene den Test ohne den Zusatz von PE durchlief. Auf die graphische Darstellung der Kontrollvene wurde verzichtet.

#### **3.1.2.1 KHP-Gruppe**

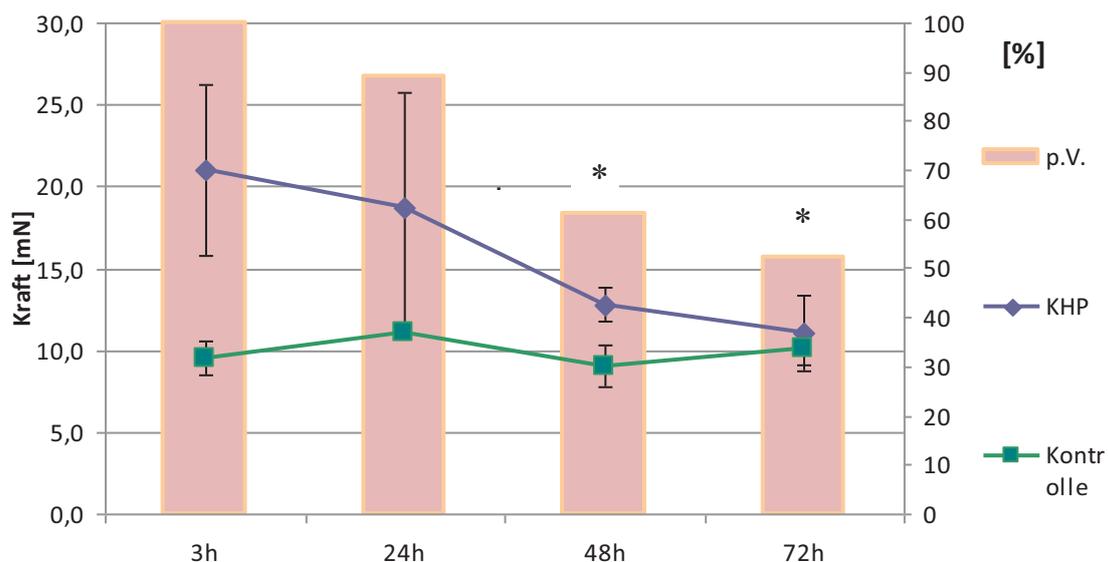
Von 24 h bis 48 h, sowie von 48 h bis 72 h nahm die Kontraktionskraft signifikant ab. Am Tag der letzten Testung kam es zu keiner Reaktion nach PE-Zusatz (Abb. 16). Es ist davon auszugehen, dass die Vene keine kontraktile Eigenschaften mehr besaß. Auch hier verringert sich die Streuung der Werte um den Mittelwert.

Bei der zeitabhängigen Darstellung war der Vergleich mit der Kontrollvene sinnvoll, da sich zeigte, dass zum Zeitpunkt 72 h kein höherer Vasotonus ( $11,0 \text{ mN} \pm 2,3 \text{ mN}$ ) als der Basistonus ( $10,1 \text{ mN} \pm 1,0 \text{ mN}$ ) erreicht wurde (Tab. 9).

Die anschließenden Versuche zeigten, daß die in KH-Puffer konservierten Venen zu allen vier Meßzeitpunkten den Venen aus beiden anderen Gruppen signifikant unterlegen waren.

**Tab. 9:** Vasokonstriktion durch Phenylephrin ( $30 \mu\text{M}$ ) bei Venen der KHP-Gruppe. Die Werte der Kontrollvenen wurden zum Verdeutlichen ebenfalls angegeben.

Lagerung	Testvenen [mN]	Kontrollvenen [mN]
3 h	$21,0 \pm 5,2$	$9,5 \pm 1,0$
24 h	$18,7 \pm 7,1$	$11,1 \pm 0,2$
48 h	$12,8 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,2$
72 h	$11,0 \pm 2,3$	$10,1 \pm 1,0$



**Abb. 16:** Phenylephrin-induzierte Kontraktionskraft und prozentuale Veränderung (p.V.). Die Kontrollvene (Kontrolle) ist nicht prozentual dargestellt. \* $p < 0,05$  vs 3 h.

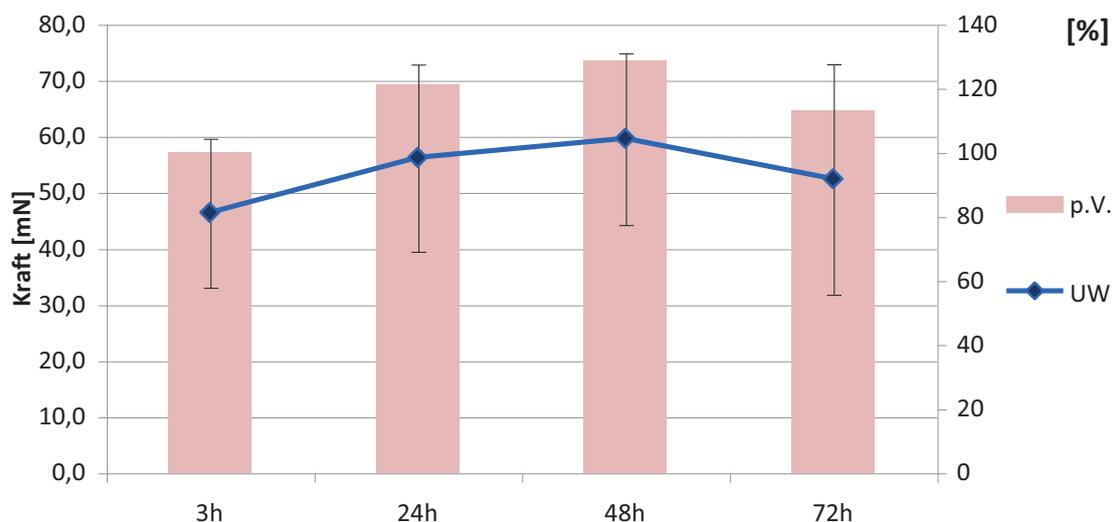
### 3.1.2.2 UW-Gruppe

Die Venen in der UW-Gruppe waren durchweg stabil. Die Kontraktionskraft stieg vom ersten ( $46,4 \text{ mN} \pm 13,3 \text{ mN}$ ) bis zum dritten Zeitpunkt ( $59,6 \text{ mN} \pm 15,3 \text{ mN}$ ) um 13 % an, um dann leicht auf  $52,4 \text{ mN} \pm 20,6 \text{ mN}$  abzufallen (Tab. 10). Es ergaben sich also keine signifikanten Änderungen über die Zeit (Abb. 17).

Die Venen der UW-Gruppe kontrahierten zu allen Meßzeitpunkten besser als die Venen der KHP-Gruppe und waren vergleichbar mit den Venen aus der TiPROTEC-Gruppe. Nach 72 h Konservierung bestand jedoch eine signifikante Unterlegenheit gegenüber der TiPROTEC-Gruppe ( $p = 0,18$ ).

**Tab. 10:** Vasokonstriktion durch Phenylephrin ( $30 \mu\text{M}$ ) bei Venen der UW-Gruppe.

Lagerung	Kontraktion [mN]	SD
3 h	46,4	13,3
24 h	56,2	16,7
48 h	59,6	15,3
72 h	52,4	20,6



**Abb. 17:** Kontraktionskraft im Phenylephrin-Test ( $\pm$  SD) über die Zeit (blaue Linie), durch prozentuale Abnahme ergänzt (rosa Balken).

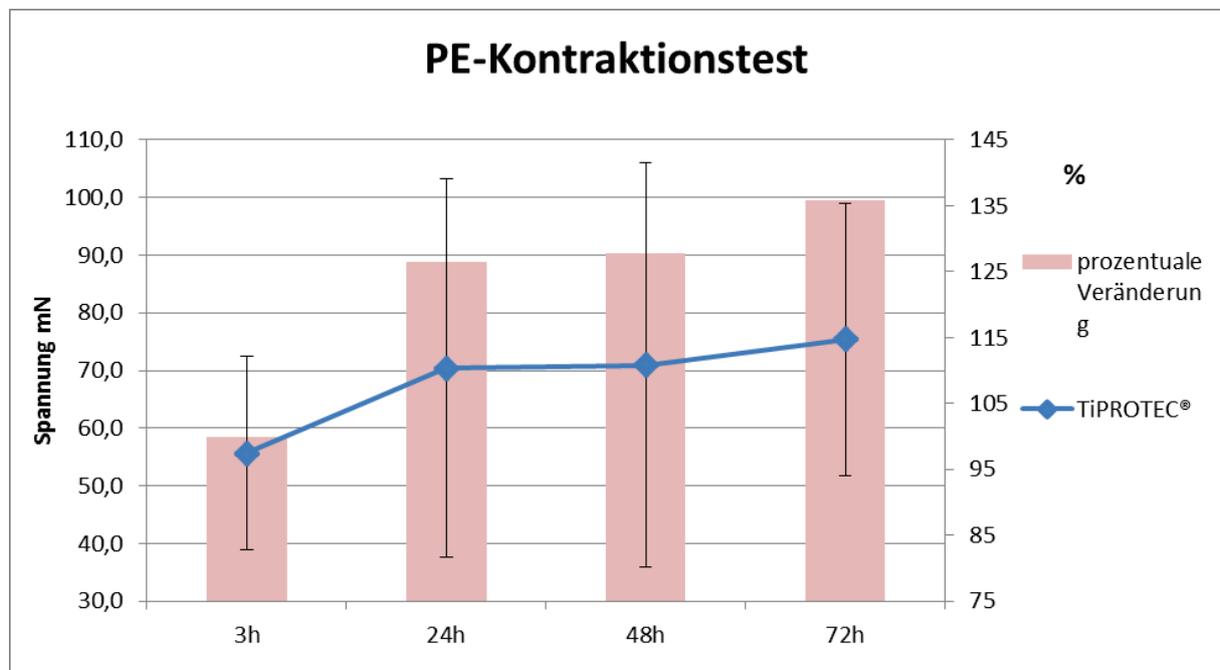
### 3.1.2.3 TiPROTEC-Gruppe

Wie schon im Rezeptor-unabhängigen KCI-Test, entwickelten die Venen unter TiPROTEC-Konservierung die größte Kontraktionskraft (Tab. 11). Vom ersten bis zum vierten Meßzeitpunkt stieg die Kraft um 36 % von  $54,6 \text{ mN} \pm 17,8 \text{ mN}$  auf  $75,5 \text{ mN} \pm 23,6 \text{ mN}$  (Abb. 18).

Die Venen in der TiPROTEC-Gruppe unterschieden sich von Anfang an signifikant von denen der KHP-Gruppe. Zum Zeitpunkt 72 h war die Kontraktionskraft signifikant besser als in der UW-Gruppe.

**Tab. 11:** Vasokonstriktion durch Phenylephrin (30  $\mu$ M) bei Venen der TiPROTEC-Gruppe.

Lagerung	Kontraktion [mN]	SD
3 h	54,6	17,8
24 h	64,2	28,6
48 h	67,4	29,7
72 h	75,5	23,6

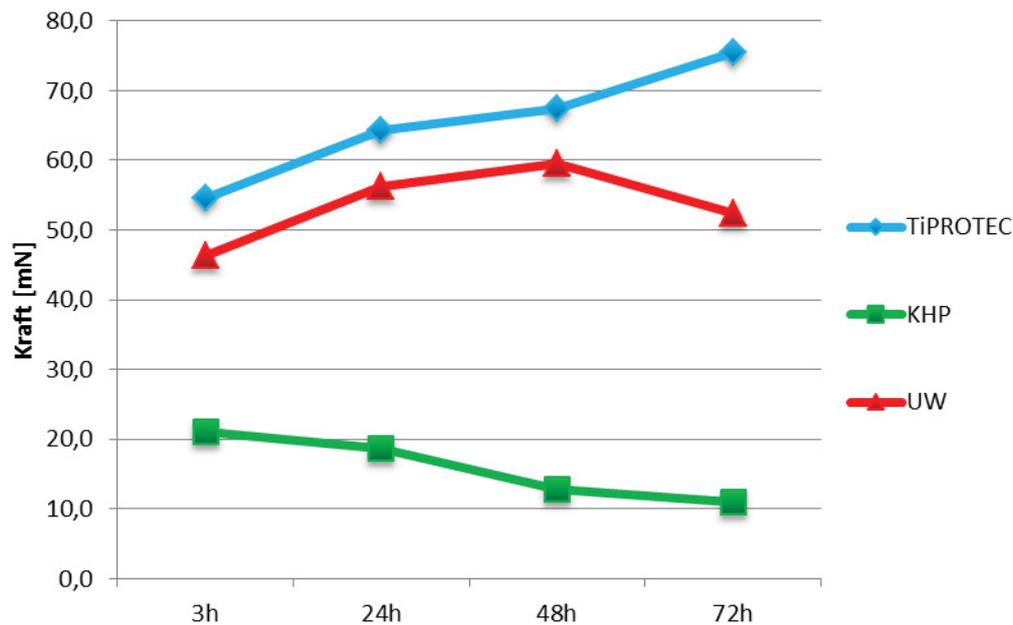


**Abb. 18:** Kontraktionskraft im Phenylephrin-Test über die Zeit (blaue Linie) , durch prozentuale Veränderung (p.V; rosa Balken) ergänzt.

### 3.1.2.4 K2: Vergleich der Konservierungslösungen

In der Zusammenstellung der Versuchsergebnisse für die vier Meßzeitpunkte werden tendenzielle Wechselwirkungen ( $p = 0,062$ ) zwischen den Gruppen ersichtlich (Abb. 19). Während die Antworten auf Phenylephrin bei den Venen der UW-Gruppe relativ zeitunabhängig waren, kam es bei der KHP-Gruppe zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft und bei der TiPROTEC-Gruppe zu

einem nicht signifikanten Anstieg der Kontraktionskraft. Statistisch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden. Innerhalb einer Gruppe (UW, TiPROTEC) kam es jedoch zu keiner signifikanten Veränderung über die Testzeitpunkte.



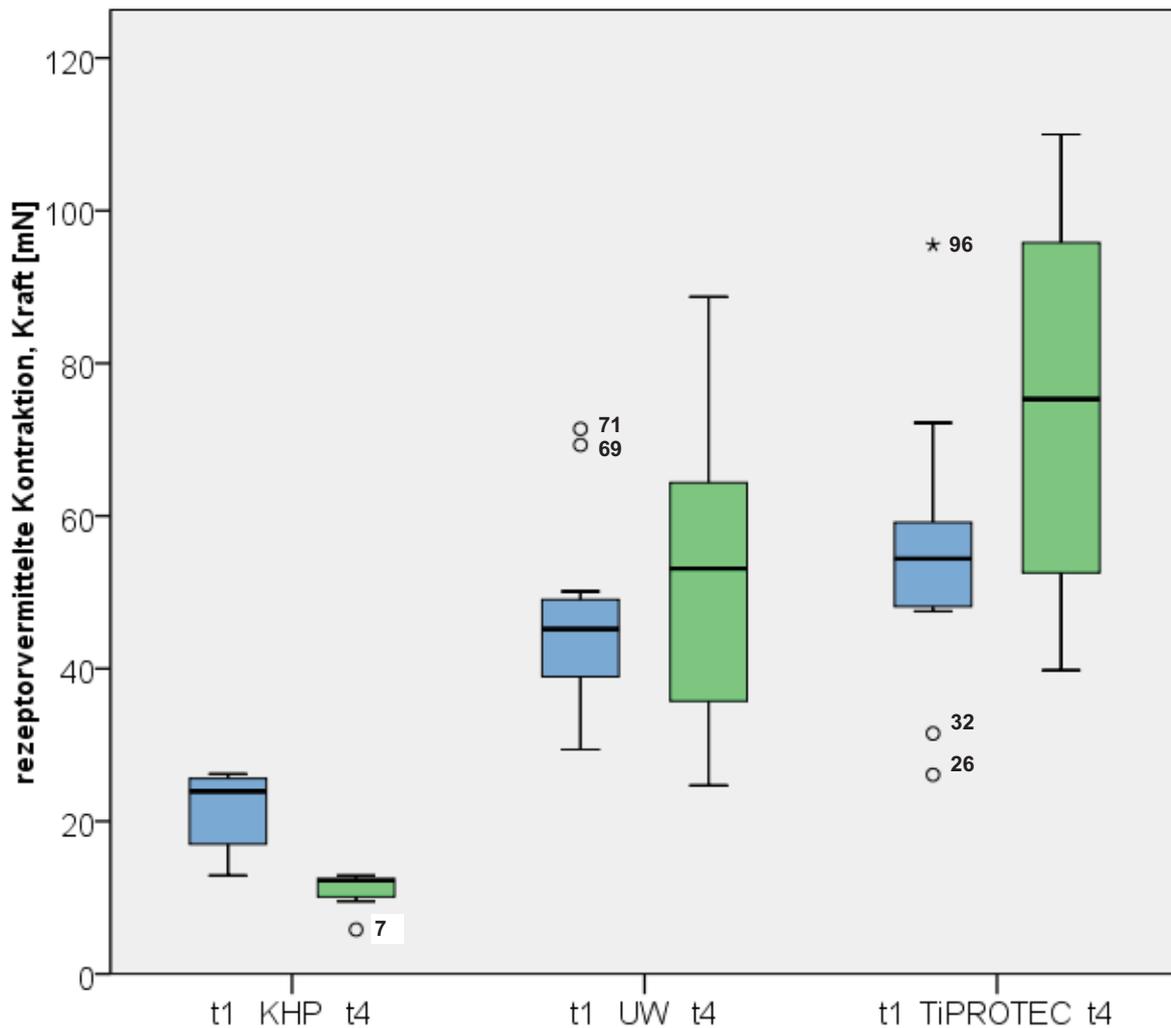
**Abb. 19:** Zeitlicher Verlauf der Kontraktionskraft bei den drei Versuchsgruppen im Phenylephrin-Test. Werden lediglich die Zeitpunkte 3 h und 72 h miteinander verglichen, kommt es in der KHP-Gruppe zu einer signifikanten Abnahme und in der TiPROTEC-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktionskraft

Vergleicht man – wie bereits bei dem Test mit dem Rezeptor-unabhängigen KCl – nur die Ergebnisse von der ersten (t1) und der vierten (t4) Messung, dann kam es in der KHP-Gruppe zu einer signifikanten Abnahme und in der TiPROTEC-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktionskraft (Tab. 12; Abb. 20).

**Tab. 12:** Abweichung von t1 zu t4 für den Phenylephrin-Test mit SD und Signifikanz

Gruppe	Kontraktionskraft; Differenz t1 - t4 [mN]	± SD	Signifikanz (2-seitig)
KHP	-9,97	4,59	0,000
UW	6,00	21,74	0,382
TiPROTEC	20,88	31,99	0,045

## Kontraktion mit Phenylephrin (K2)



**Abb. 20:** Boxplotdarstellung der Phenylephrin-Antwort nach 3 h (t1) (= blau) und 72 h (t4) (= grün) Konservierung. Ausreißer (Kreise) und Extremwerte (Sternchen) sind mit der Größe der Kontraktionskraft (mN) angegeben.

### 3.1.3 Endothel-abhängige Relaxation

Die Relaxation durch Acetylcholin (ACh) wird sowohl in absoluten als auch in relativen Werten angegeben. Es wurde also einmal die Differenz zwischen der Maximalkontraktion nach Phenylephrin (PE; 30  $\mu$ M) und der minimalen Kontraktion nach ACh mit den jeweiligen Absolutwerten berechnet. Zur Berechnung der relativen Werte wurde die jeweilige Maximalkontraktion auf 100 % gesetzt. Mit der Präsentation der Relativwerte wurde versucht, die biologische Streuung zu reduzieren, so daß mögliche Trends statistisch deutlicher wurden.

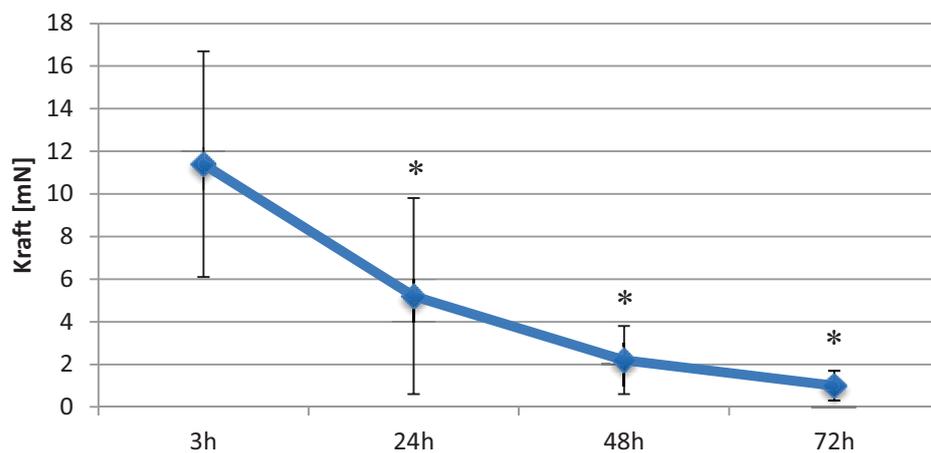
### 3.1.3.1 KHP-Gruppe

Zum Zeitpunkt 3 h unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant voneinander. Die Venen der KHP-Gruppe relaxierten analog zur Kontraktion Über alle Messzeitpunkte nahm die Relaxation ab. Parallel dazu nahm auch die Standardabweichung von 5,3 mN auf 0,7 mN ab (Tab. 13). Das heißt, die Relaxationsfähigkeit auf ACh-Gabe nahm im gesamten KHP-Kollektiv gleichmäßig und gleichzeitig ab, alle Venen wurden schlechter.

Die Auswertung der relativen Werte ergab keine bedeutsamen Unterschiede.

**Tab.13:** Relaxation durch Acetylcholin; absolute und relative Mittelwerte  $\pm$  SD.

Zeit	Mittelwert		$\pm$ SD	
	(mN)	(%)	(mN)	(%)
3 h	11,4	53,2	5,3	17,4
24 h	5,2	25,7	4,6	20,7
48 h	2,2	16,7	1,6	11,3
72 h	1,0	10,2	0,7	7,8



**Abb. 21:** KHP-Gruppe. Relaxation durch Acetylcholin nahm im Zeitverlauf ab; absolute Mittelwerte  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$  vs 3h

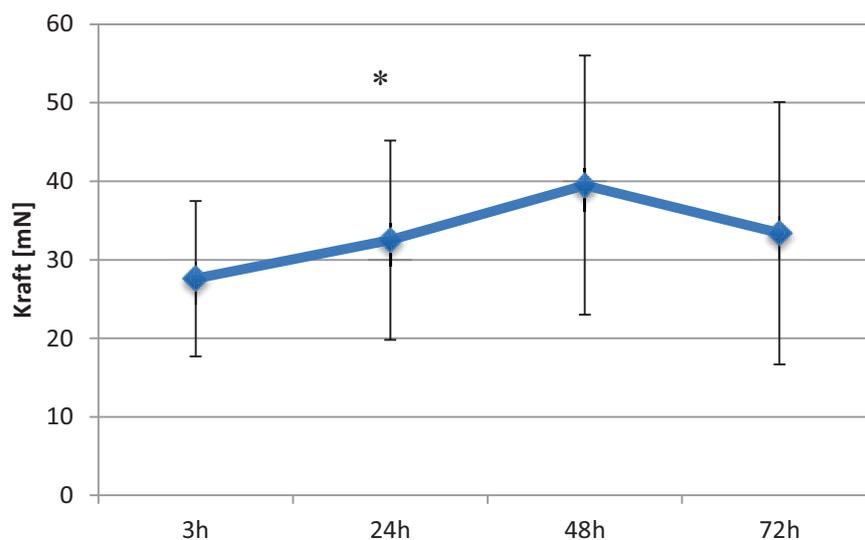
### 3.1.3.2 UW-Gruppe

Die Venen in der UW-Lösung verbesserten ihre Relaxationsfähigkeit (Tab. 14) ähnlich wie ihre Kontraktionsfähigkeit vom ersten (= 3 h) zum zweiten (= 24 h) Messzeitpunkt. Diese Verbesserung war für die absoluten Werte statistisch signifikant ( $p = 0,043$ ) und für die relativen Werte nicht signifikant. Die weitere (48 h) Relaxationsverbesserung war gegenüber dem vorherigen Wert ebenso wie die anschließende Relaxationsverschlechterung (72 h) nicht signifikant (Abb. 22).

Zu allen Messzeitpunkten bestand eine signifikante Überlegenheit gegenüber den Venen der KHP-Gruppe.

**Tab. 14:** UW-Mittelwert und SD-Tabelle für die kompletten Datensätze.

Zeit	Mittelwert		± SD	
	(mN)	(%)	(mN)	(%)
3 h	27,6	59,7	9,9	14,2
24 h	32,5	57,5	12,7	11,6
48 h	39,5	63,2	16,5	14,1
72 h	33,4	60,8	16,7	11,1



**Abb. 22:** UW-Gruppe. Relaxation durch Acetylcholin; absolute Mittelwerte ± SD \* $p < 0,05$  vs 3 h

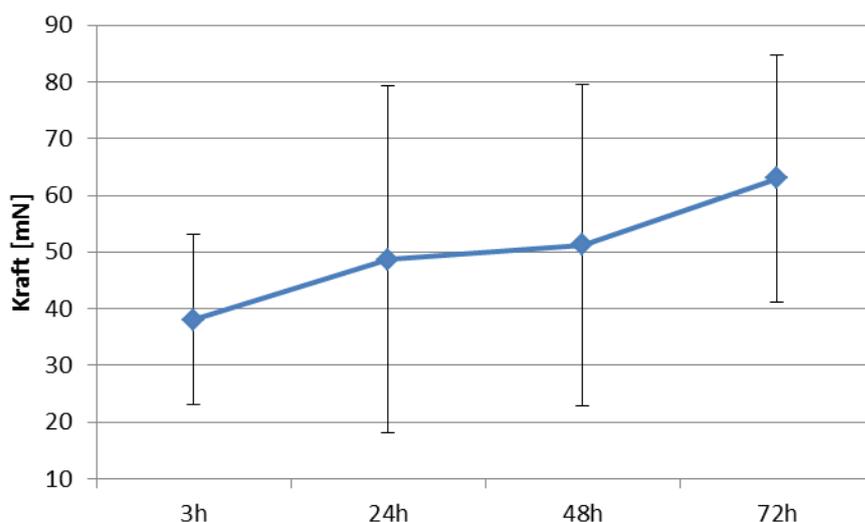
### 3.1.3.3 TiPROTEC-Gruppe

Bei den Venen der TiProtec-Gruppe kam es zu einer nicht signifikanten, aber konstanten Verbesserung der Relaxation über den Versuchszeitlauf (Tab. 15). Die relative Relaxation zum Zeitpunkt 72 h war allerdings gegenüber dem Zeitpunkt 3 h signifikant verbessert (Tab. 15). Bemerkenswert war, dass die relative Standardabweichung vom Zeitpunkt 3 h zum Zeitpunkt 72 h abnahm (12,7 vs 4,3 %).

Die in TiPROTEC konservierten Venen erreichten zu allen Testzeitpunkten signifikant bessere Ergebnisse als die Venen der KHP-Gruppe. Zum Zeitpunkt 72 h sind sie auch den Venen der UW-Gruppe signifikant überlegen

**Tab. 15:** Mittelwerte und SD der TiPROTEC Venen.

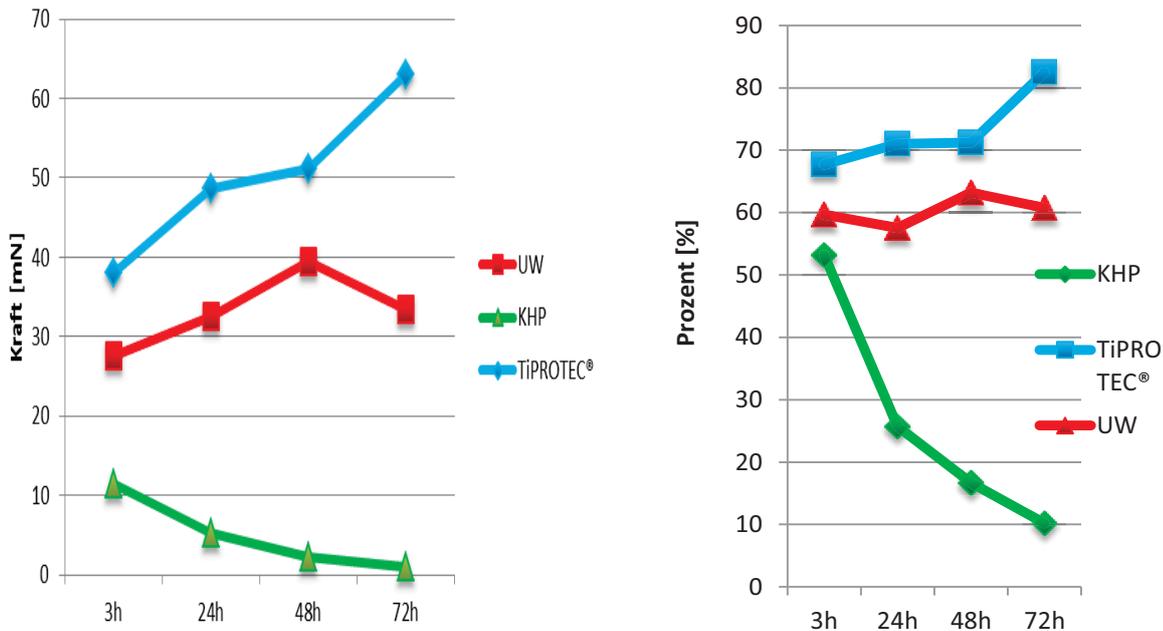
Zeit	Mittelwert		± SD	
	(mN)	(%)	(mN)	(%)
3 h	38,1	67,7	15,1	12,7
24 h	48,7	71,0	30,5	13,2
48 h	51,2	71,2	28,3	14,4
72 h	63,0	82,5	21,8	4,3



**Abb. 23:** UW-Gruppe. Relaxation durch Acetylcholin; absolute Mittelwerte ± SD

### 3.1.3.4 Relaxation: Vergleich der Konservierungslösungen

Die Gruppen unterscheiden sich hochsignifikant in ihrem Relaxationsverhalten nach ACh-Gabe ( $p < 0,01$ ). Die Versuchsgruppen veränderten sich nicht signifikant über die Zeit (Test of Whithin-Subjects Effects nach Greenhouse-Geissner). Die Wechselwirkungen zwischen den Gruppen und Zeitpunkten waren jedoch signifikant (Abb. 24).



**Abb. 24:** Relaxation durch Acetylcholin. Die absoluten (links) und die relativen (rechts) Werte entwickelten sich über die Zeit für die drei Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich. Das Relaxationsvermögen nahm in der KHP-Gruppe während des Protokollverlaufes ab, während sie in der TiPROTEC-Gruppe zunahm.

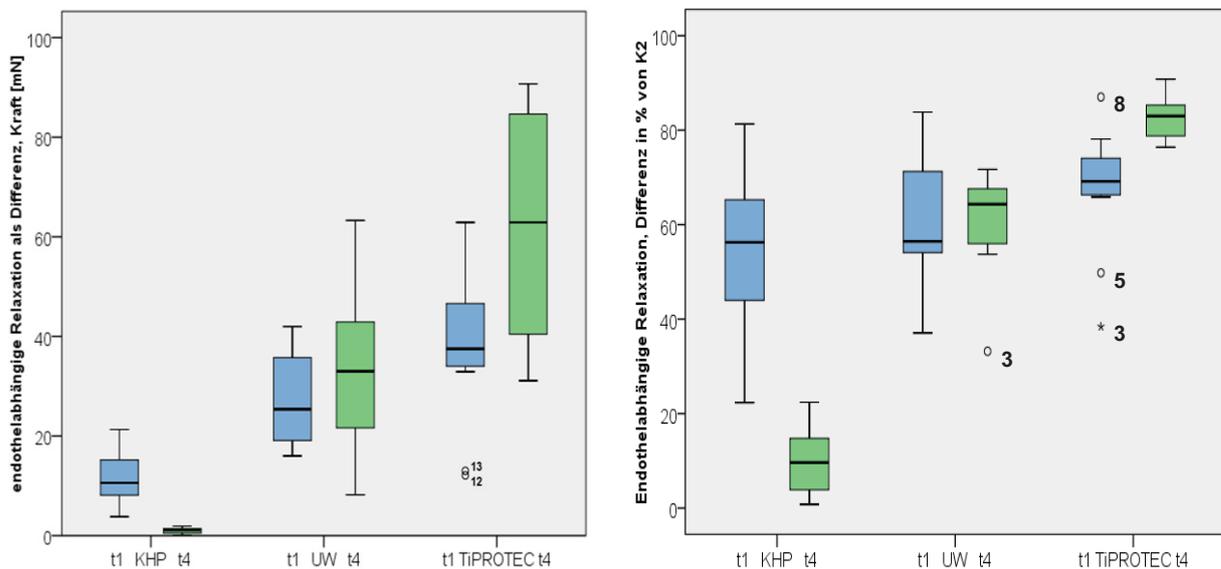
Erneut wurden die Resultate ausschließlich für die Langzeitkonservierung – also zwischen dem ersten (3 h; t1) und dem letzten Meßzeitpunkt (72 h; t4) – verglichen. Das Relaxationsverhalten der Venen der KHP-Gruppe verschlechterte sich signifikant, während sich das Relaxationsverhalten der Venen der Tiprotec-Gruppe signifikant verbesserte (Tab. 16). Die Relaxation in der UW-Gruppe blieb im Wesentlichen unverändert.

**Tab. 16:** Relaxation durch Acetylcholin. Absolute und relative Differenzen zwischen dem Relaxationswerten zum Meßzeitpunkt 3 h (t1) und 72 h (t4). Unabhängig davon, ob die absoluten oder die relativen Werte herangezogen wurden, ergaben sich für die KHP-Gruppe und die TiPROTEC-Gruppe signifikante Unterschiede

Gruppe	Relaxation; Differenz t1 - t4		SD		Signifikanz (2-seitig)	
	(mN)	(%)	(mN)	(%)	absolut	relativ
<b>KHP</b>	-10,4	-43,0	4,9	13,6	,000	,000
<b>UW</b>	5,8	1,1	11,9	9,2	,137	,700
<b>TiPROTEC</b>	24,9	14,8	26,8	13,2	,008	,003

In der Boxplot-Darstellung (Abb. 25) ist die Entwicklung der Relaxation bei der ersten (t1) und letzten (t4) Messung zu sehen. Die Werte für die UW- und die TiPROTEC-Gruppe waren gleichmäßig um den Median verteilt. KHP-konservierte Venen besaßen zum letzten Testzeitpunkt kaum noch Relaxationsfähigkeit.

### Relaxation mit Acetylcholin



**Abb. 25:** Boxplots der ACh-Antwort in den drei Versuchsgruppen nach 3 h (t1)(= blau) und 72 h (t4) (= grün). Beide Präsentationen (links: absolute Werte; rechts: relative Werte) zeigen einheitlich die verschlechterte Relaxation in der KHP-Gruppe und die Verbesserung bei der TiPROTEC-Gruppe.

Die Boxplot-Darstellung zeigt die starke Abnahme der Relaxationsfähigkeit bei der KHP-Gruppe. Die Darstellung zeigt auch, dass die Verteilung der Werte um den Median in der UW-Gruppe nach 3 h mehrheitlich über dem Median, nach 72 h bei größerem Median eher darunter konzentriert ist. Die verringerte Streuung um den Median nach 72 h TiPROTEC-Konservierung ersichtlich.

Insgesamt ergab sich bei der Studie zur Funktion ein recht einheitliches Bild für das zeitabhängige Kontraktions- und Relaxationsverhalten für die jeweiligen Konservierungslösungen: Kontraktions- und das Relaxationsverhalten in der KHP-Gruppe verschlechterten sich zeitabhängig, und sie verbesserten sich in der TiPROTEC-Gruppe.

## **3.2 Untersuchungen zur Morphologie**

Die Untersuchungen mit der konfokalen Lasermikroskopie wurden an Tag 1 und an Tag 10 durchgeführt. Veränderungen zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten waren bei allen Präparaten zu erkennen, allein die Ausprägung differierte. Dies wird im folgenden Abschnitt erläutert.

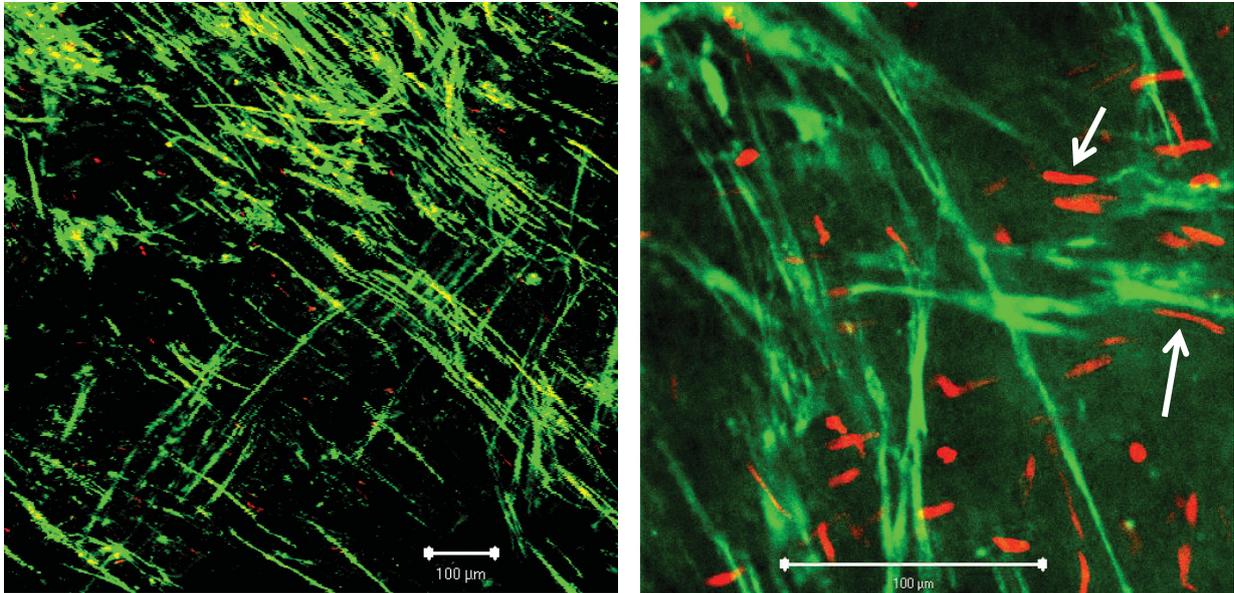
Längs und quer verlaufende, grün fluoreszierende Strukturen, welche glatte Muskelzellen (im Durchschnitt 20 - 200  $\mu\text{m}$  lang und 3 – 10  $\mu\text{m}$  breit) und vereinzelte Fibroblasten darstellen. Nekrotische markierte Zellen, rot fluoreszierend, sind deutlich eingestreut, sonst überwiegen intakte CMFDA-grün fluoreszierende Zellen. Die schwarzen Felder erklären sich durch das Aufklappen und eine leichte Wellung der Vene auf dem Objektträger aufgrund ihrer natürlichen Eigenspannung.

### **3.2.1 KHP-Gruppe**

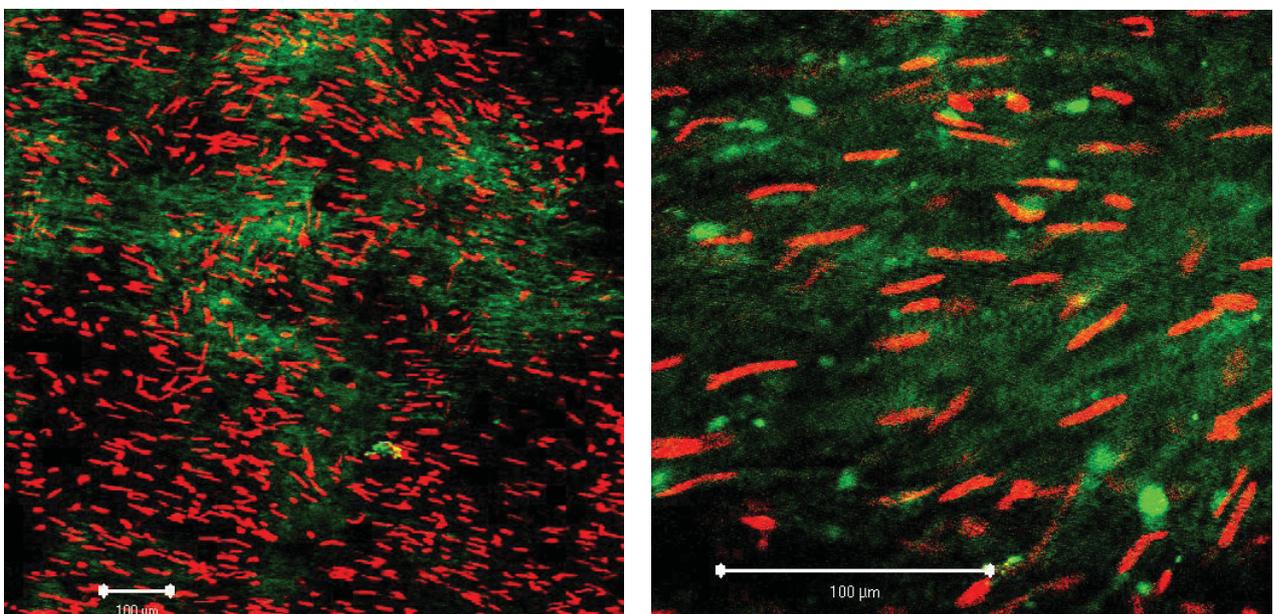
Die in KH-Puffer konservierten Venen zeigten über den Untersuchungszeitraum die am stärksten ausgeprägte Zunahme nekrotischer Zellen (Rotfluoreszenz; Abb. 26).

In der Detailaufnahme wird z.T. schon eine leicht verwaschene Kontur der Muskelzellen (Abb. 26) sichtbar. Einige Endothelzellen - deutlich mehr als bei den anderen beiden Konservierungsmethoden - waren in den oberen Schichtaufnahmen

bereits PI-positiv (hier nicht dargestellt). Die langgezogenen Zellkerne (weiße Pfeile) aus dieser Schnittebene passen sowohl zu Myo- als auch zu Fibrozyten.



**Abb. 26:** Venensegment aus der KHP-Gruppe am Tag 1. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung Die weißen Pfeile zeigen auf glatte Muskelzellen, passen aber auch zu Fibroblasten; weißer Balken: jeweils 100  $\mu\text{m}$

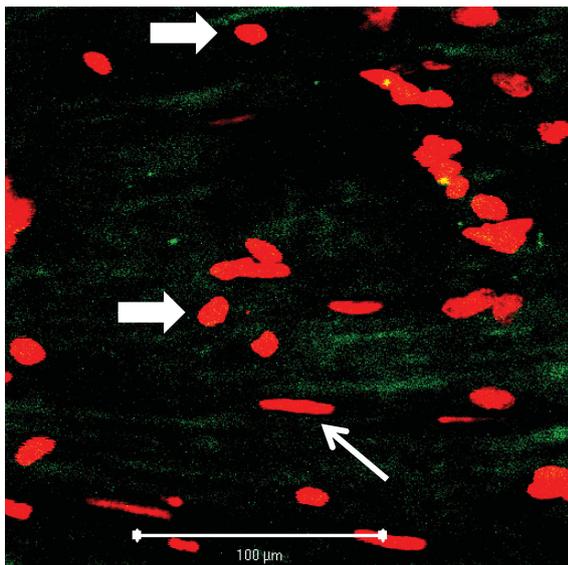


**Abb. 27:** Venensegment aus der KHP-Gruppe am Tag 10. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung. Gegenüber der Abb. 31 hat die Rotfluoreszenz (= nekrotische Zellen) deutlich zugenommen. weißer Balken: jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

Am Tag 10 ist eine deutliche Zunahme der durch Propidiumiodid (PI)-gefärbten, nekrotischen Zellen zu verzeichnen. Die langen spindeligen Muskulariszellen haben ihre vorherige Struktur verloren, die grünen-fluoreszierenden Myozyten und Endothelzellen erscheinen zunehmend verwaschen (Abb. 27).

Auffallend an der Detailvergrößerung ist der Verlust der am Tag 1 recht deutlichen Zellverbandstruktur der grün fluoreszierenden Muskel- und Endothelzellen. Sie wirken wie ausgeblühten.

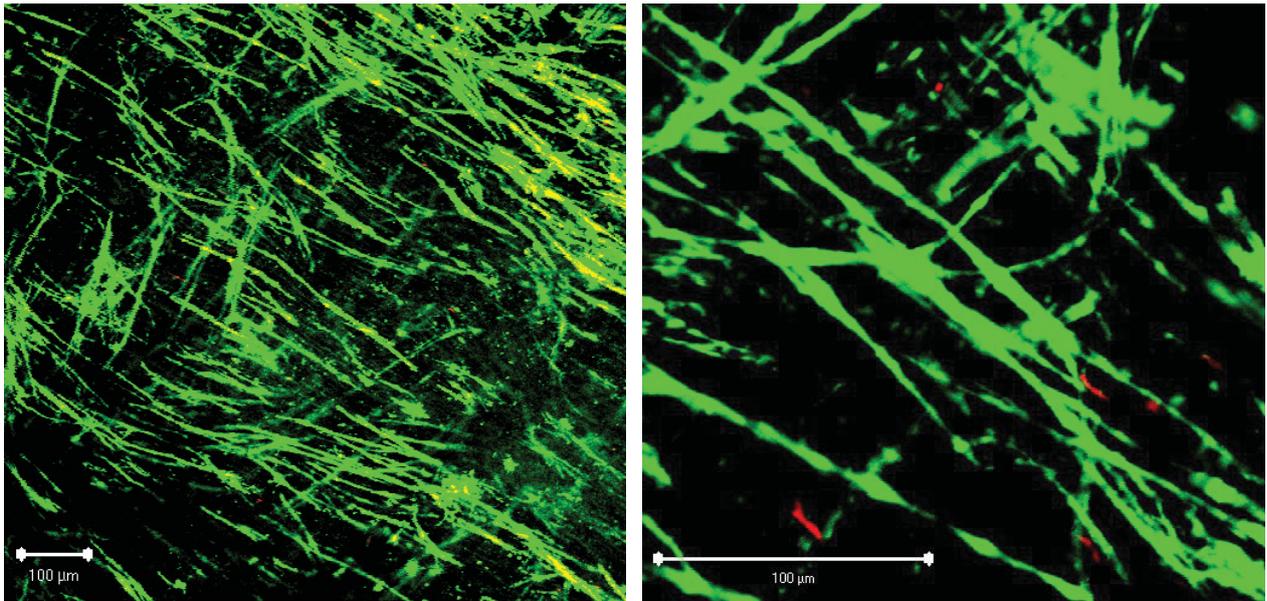
In der Endothelschicht-Aufnahme (Abb. 28) sind zahlreiche PI-positive Zellen, also nekrotische Zellen, erkennbar (rundlich-ovale Zellkerne, mit weißem dicken Pfeil). Auch hier sind einige Fibroblasten eingestreut (längliche Zellkerne, mit dünnem Pfeil gekennzeichnet). Die Muskularis schimmert von unten grün durch.



**Abb. 28:** Endothelzellschicht, 40fache Vergrößerung. Dicker weißer Pfeil zeigt auf eine PI-positive Endothelzelle, schlanke Pfeile zeigen auf PI-positive Myozyten.

### 3.2.2 UW-Gruppe

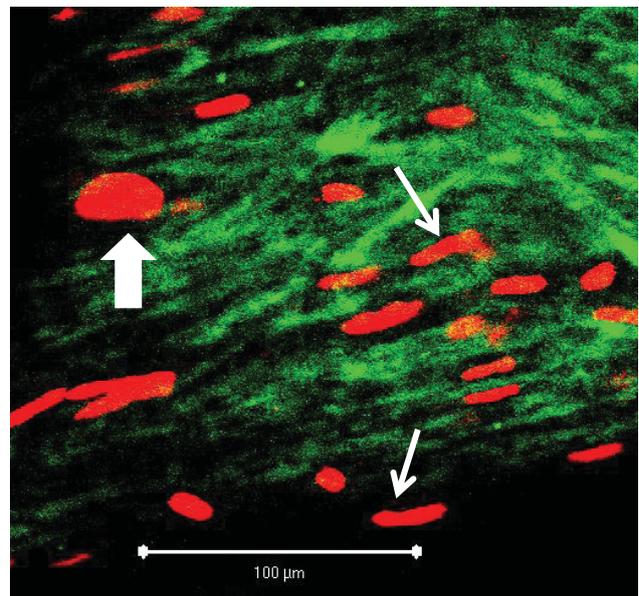
Über die Zeit änderte sich die Fluoreszenz aber quantitativ weniger stark ausgeprägt als in der KHP-Gruppe. Auch die Ausgangsqualität der Vene am Tag 1 (nach 3 h Konservierung) war insgesamt besser als in der KHP-Gruppe (Abb. 29).



**Abb. 29:** Venensegment aus der UW-Gruppe am Tag 1. Die Ausgangsqualität schien eingangs etwas klarer und physiologischer als bei der KHP-Gruppe. links: 10fache Vergrößerung; rechts: Detail in 40facher Vergrößerung ; weißer Balken: jeweils 100 μm

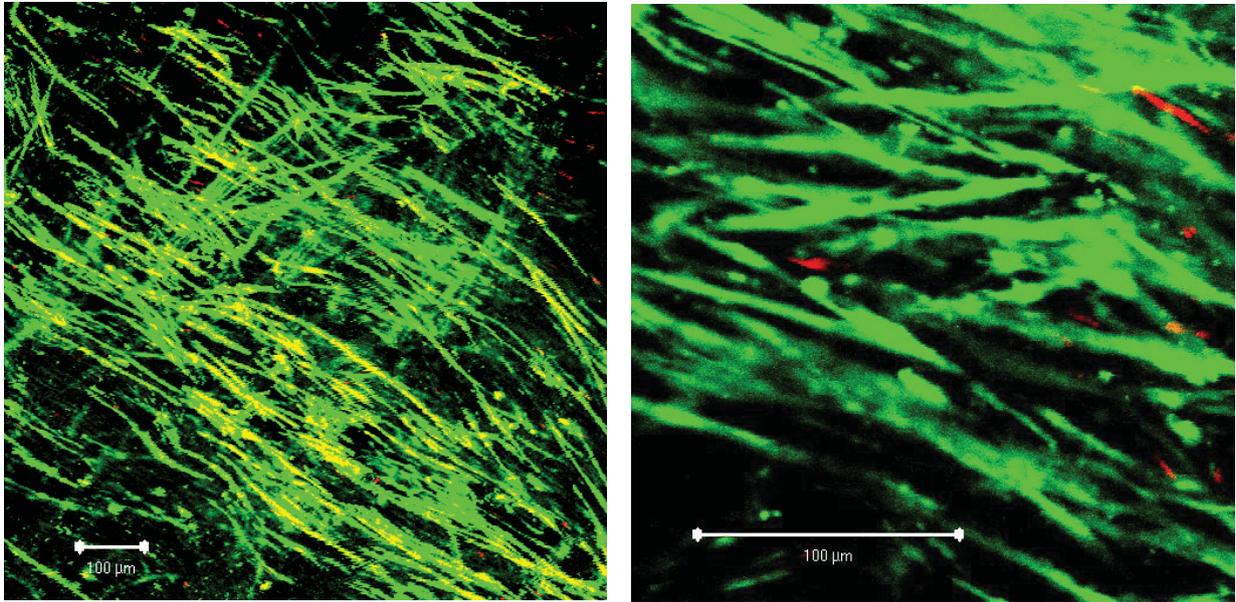
Am Tag 10 zeigte sich eine deutliche Zunahme der nekrotischen (= PI-positiven) Zellen. Auch die Muskularis erschien körnig und aufgelockert (Abb. 30). Die Abbildung zeigt einen Schnitt, in welchem sowohl ein Teil der Muskularis als auch längliche PI-positive Fibroblasten und Endothelzellen angeschnitten sind.

**Abb. 30:** Venensegment aus der UW-Gruppe am Tag 10. Detail in 40facher Vergrößerung. Grün-fluoreszierende vitale Zellen vs. rot fluoreszierende, apoptotische Zellen. Dicker weißer Pfeil zeigt auf eine PI-positive Endothelzelle, schlanke Pfeile zeigen auf PI-positive Myozyten; weißer Balken: 100 μm



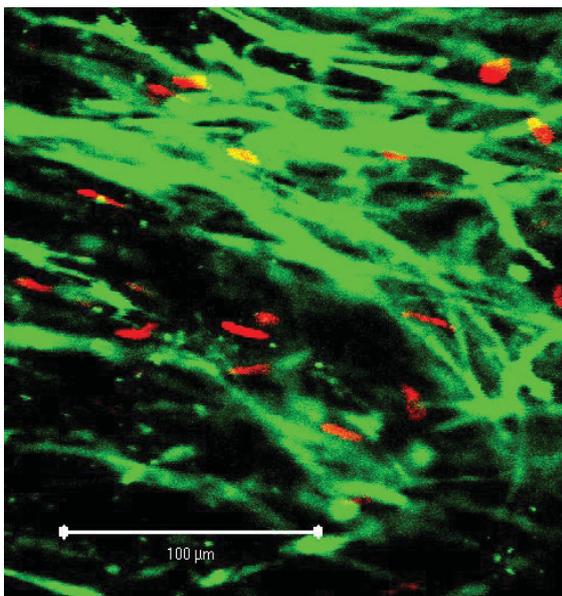
### 3.2.3 TiPROTEC-Gruppe

Am Tag 1 (3 h) glichen Qualität und Färbeverhalten den Venen mit UW-Konservierung. Es waren wenig nekrotische Zellen sichtbar, und die Struktur kam dicht und scharf zur Geltung (Abb. 31).



**Abb. 31:** Venensegment aus der TiPROTEC-Gruppe am Tag 1. Detail in 40facher Vergrößerung; weißer Balken: 100  $\mu\text{m}$  10fache Vergrößerung, 1.Tag. TiPROTEC-Konservierung.

Der Strukturverlust war nach 10 Tagen Konservierung am geringsten (Abb. 32). Es kam weitgehend nicht zur Verkörnung, Vergrößerung und Auflockerung der Matrix. Diese Venen hatten im Vergleich zu den anderen Konservierungsverfahren signifikant weniger nekrotische Zellen, insbesondere in der Endothelzellschicht.



Offensichtlich ermöglicht die Kaltlagerung in TiPROTEC eine bessere Protektion vitaler Zellen.

**Abb. 32:** Venensegment aus der TiPROTEC-Gruppe am Tag 10. Es zeigten sich nur wenige PI-gefärbte Zellen. Im Unterschied zu den beiden anderen Konservierungslösungen blieben die grün-fluoreszierenden Zellen in Ihrer Struktur erhalten. Detail in 40facher Vergrößerung; weißer Balken: 100  $\mu\text{m}$  10fache Vergrößerung, 1.Tag. TiPROTEC-Konservierung

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse: Funktion und Morphologie**

Eine effiziente Lagerung von Gefäßtransplantaten ist für deren Erhalt notwendig. Die vorliegende Studie zeigt den großen Einfluss der Konservierungslösung sowohl auf funktionelle Eigenschaften als auch auf die histo-morphologische Integrität.

Die Untersuchungen ergaben:

- Auch eine kurzzeitige Lagerung explantierter Venen sollte nicht in normalen Puffern wie dem KH-Puffer stattfinden.
- Die UW-Lösung ermöglicht auch für 48 h Lagerung gute Ergebnisse. Nach 72 h lässt die Protektion nach.
- Die TiPROTEC-Lösung weist nach 72 h insgesamt die beste Funktion auf.
- Die kontraktile und relaxierende Antwort der Venen (Organbad) korreliert mit dem Verhältnis von toten zu vitalen Endothelzellen und der Ordnung im Zellverband (konfokale Lasermikroskopie).

## 4. Diskussion

Gefäßtransplantation und Konservierung gewinnen in den letzten Jahrzehnten immer stärker an Bedeutung. Lange ist eine Schädigung durch Transplantatlagerung bekannt, der Mechanismus der Kälteschädigung gewinnt aber erst in den letzten Jahren an Bedeutung. Die Forschung mit Lösungen, die hierbei präventiv wirken, ist jung. Für Kornealzellen, kultivierte Endothelzellen, Hepatozyten, Schweine-Aortensegmente, Ratten-Mesenterialarterien und Ratten-Aortensegmente ist die Prävention der Kälteschädigung schon nachgewiesen (Rauen et al, 2006; Rauen et al, 2008; Wille et al, 2008). Das Gleiche gilt auch für die humane Arteria mammaria interna (Garbe et al, 2011)

Die Suche nach einer immer besseren Konservierung geht weiter. In der vorliegenden Studie wurden daher der Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), die in der Klinik etablierte, intrazelluläre University of Wisconsin-(UW)-Lösung und eine neue extrazelluläre Lösung (TiPROTEC) miteinander auf ihre Fähigkeit verglichen, humane Vena saphena magna bis zu 72 h nach Entnahme zu konservieren. Zur Erfassung der Konservierungsfähigkeit wurden in einem funktionellen Teil (Organbad) die Rezeptor-unabhängige Kontraktion, die Rezeptor-abhängige Kontraktion und die Endothel-abhängige Relaxation erfaßt. In einem morphologischen Teil wurde die zelluläre Vitalität (konfokale Lasermikroskopie) untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- Es bestehen große Unterschiede in der Qualität der Gefäßkonservierung.
- Selbst für eine kurzzeitige Lagerung explantierter Venen sollte auf den KH-Puffer verzichtet werden.
- Die UW-Lösung lieferte auch nach 48 h Lagerung gute Ergebnisse, welche aber nach 72 h verloren gingen.
- Für die TiPROTEC-Lösung ergaben sich bis zu 72 h die besten Ergebnisse zur Funktion.
- Das gute funktionelle Ergebnis für TiPROTEC wurde durch die Vitalitätsstudie (konfokale Lasermikroskopie) bestätigt.
- Für die drei Lösungen korrelierten die Kontraktions- und Relaxationseigenschaften mit dem Verhältnis zwischen toten und lebenden Zellen.

- TiPROTEC bietet sich – vermutlich wegen der enthaltenen Eisenchelatoren – als eine vielversprechende Alternative zur Kurz- und Langzeitkonservierung humaner Venen an.

## **4.1 Methodenkritik**

### **4.1.1 Grenzen der Organbadversuche**

Um Organe *ex vivo* zu untersuchen, werden weltweit Organbäder eingesetzt. Mit diesem experimentellen Modell verbindet sich eine gute Übersichtbarkeit, weitgehende Temperaturkonstanz und gute Vergleichbarkeit. .

Dennoch gibt es Reihe von Störgrößen:

1. Inkonstante Nährlösung durch pH- oder Temperaturschwankungen und Veränderungen der Begasung,
2. Schädigung von Vene und Endothel durch das Aufspannen in den Organbädern und die in der Äquilibrierungs- Phase aufgebaute Vorspannung,
3. Schädigung durch eine übereilte Wiedererwärmung nach Kaltlagerung,
4. Ausfall der Technik, z.B.: Carbogen-Begasung, Wärmeanlage, Absaugung,
5. Erschütterungen in der näheren Umgebung. Diese können in der Registrierung schwer zu interpretierende Ausschläge verursachen und z.B. die Kalibrierung beeinträchtigen.

Für die vorliegende Untersuchung konnten die ersten beiden Punkte weitgehend ausgeschlossen werden. Bei den Versuchen wurde darauf geachtet, daß die Erwärmung der Venenabschnitte auf physiologische Temperaturen – Punkt 3 – nicht übereilt stattfand. Die letzten beiden Punkte führten in fünf Fällen zum vorzeitigen Ausschluss aus der Versuchsreihe.

### **4.1.2 Qualität der Venen**

Die Venen wurden bei Bypassoperationen gewonnen. In Abhängigkeit von der Operationsdauer, differierte die Zeitspanne von der Präparation der Vene und der anschließenden Lagerung in NaCl-Lösung bis zur Lagerung in der entsprechenden Konservierungslösung.

Auch ein chirurgisches Trauma muß berücksichtigt werden. Zunächst hängt dieses von den Fähigkeiten des Operateurs ab. Zusätzlich kann die Überdruckspülung mit NaCl-Lösung zum Auffinden von Leckagen zu Schädigungen führen, die für Endothel und Muskularis unterschiedlich ausfallen können. Daher erfolgte die Testung der Funktion für die Muskularis Rezeptor-abhängig (Phenylephrin), und für das Endothel wurde Acetylcholin verwendet (Furchgott & Zawadzki, 1980)

Wahrscheinlich wurden Venen mit unterschiedlichen qualitativen Gegebenheiten durch die randomisierte Verteilung gleichmäßig auf die drei Gruppen verteilt.

#### **4.1.3 Probenumfang, Statistik**

Die anfängliche Stichprobenumfang (KHP-Gruppe: 26, UW-Gruppe: 26, TiPROTEC-Gruppe: 25) war im Vergleich zu anderen, methodisch ähnlichen Studien ansehnlich (Bas 2002: 14 und 13 Venen; Saklak 2004: 12 und 13 Venen).

Nach dem Eingangstest mit KCl wurden die dysfunktionellen Venen verworfen. Damit ergaben sich neue, etwas ungleich große Stichproben (KHP-Gruppe: 15, UW-Gruppe: 18, TiPROTEC-Gruppe: 19). Damit fielen aus den Gruppen 42, 31 bzw. 24 % der ursprünglichen Venen aus. Bei der späteren Auswertung ergab sich eine weitere Reduktion, weil nicht alle Protokollschritte mit allen Venen durchgeführt werden konnten. Letztlich verblieben folgende komplette Datensätze: KHP-Gruppe: 9, UW-Gruppe: 11, TiPROTEC-Gruppe: 12. Die Tatsache, daß nur 35, 42 bzw. 48 % aller in der Herzchirurgie erhaltenen Venen das gesamte Protokoll durchliefen und auswertbare Daten lieferten, spricht für die experimentelle Komplexität.

Durch die Randomisierung auf die Versuchsgruppen kann von einer qualitativ vergleichbaren Bestückung der Gruppen ausgegangen werden. Nach Bortz (1993) ist daher im Hinblick auf die Statistik davon auszugehen, dass kein gravierender Entscheidungsfehler auftrat.

## **4.2 Organkonservierungslösungen**

Die muskuläre und endotheliale Funktion von Gefäßtransplantaten läßt sich zwischen 24 - 48 h erfolgreich aufrechterhalten (Bas 2002, Neil et al, 2002, Janssen et al, 2004, Bastiaane et al, 2006). Ziel einer modernen Transplantations-

medizin sollte Verlängerung, dieser Zeitspanne sein, um die Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Allotransplantate zu erhöhen.

Eine zur Vasoprotektion verwendete Konservierungslösung sollte auf die Besonderheiten des Gefäßsystems eingehen. Ein venöser Graft leidet beispielsweise unter der abrupten Umstellung auf den arteriellen Blutdruck (Nancy et al, 1995). Andererseits kann es durch die Expression des von-Willebrandt-Faktors direkt zur primären Hämostasie kommen. Auch vor oxidativem Stress sollte das Transplantat bestmöglich geschützt werden, der sowohl während der hypothermen Lagerung als auch bei der Wiedererwärmung und Reperfusion erhöht ist.

Wichtig ist, die Frühokklusionsrate (< 30 Tage) zu senken, die auf technisch-präparationsbedingte Schädigung, ungünstige Ein- und Ausflusssituation der Anastomosenregion und damit durch Verwirbelungen entstehende Turbulenzen bei kleinem Gefäßdurchmesser und Endothelzellschäden zurückzuführen ist (Campbell et al, 1981, Fuster et al, 1986, O'Neil et al, 1994). Die meisten Autoren gehen davon aus, dass das Transplantatversagen als Langzeitfolge der Intimahyperplasie zu sehen ist (Towne 1989), die auf einen multifaktoriellen Endothelschaden (Ross 1981) zurückzuführen ist. Dabei ist hervorzuheben, daß bereits nach 7 Tagen (Bush et al, 1986) bis zu 14 Tagen (Shinsuke et al, 1990) eine Reorganisation des Endothels erfolgt. Die Protektion des Endothels sollte daher im Vordergrund stehen.

Die relativ kleinen Venen werden während der Lagerung von beiden Seiten von Lösung umspült. Daher herrscht während der Lagerung der atmosphärische Sauerstoffpartialdruck (Mertens, S. et al., 1990) an der Innen- und Außenseite des Gefäßes. Eine Schädigung durch Hypoxie ist also weniger ausgeprägt, als bei Gefäßen in großen Organen. Andererseits kommt es bei Normoxie zur Radikalbildung und zu Oxidationsprozessen (Abb. 1).

#### **4.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer**

Dieser bereits 1932 (Krebs & Henseleit) entwickelte Puffer wird häufig bei Organbad-, Zellkultur- und Perfusions-Experimenten verwendet. Seine Bicarbonat-Pufferkapazität soll den pH-Wert im physiologischen Bereich halten. Nach Sigaard-Anderson (1963) liegt der pKa für Kohlensäure bei 6,1. Der pH-Wert ist von einer konstanten 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung abhängig. Bei einer Lagerung ohne

konstante Begasung kann sich der pH-Wert deutlich alkalisieren. So war nach Herzperfusion und Kontakt zu atmosphärischer Luft der pH-Wert von 7,4 auf 7,8 angestiegen (Bailey und Ong, 1978). Unter ständiger Bicarbonat-Begasung hingegen, bleibt der pH-Wert im physiologischen Bereich. Entstehende Säuren können daher stetig ausgeglichen werden.

Die schlechten Ergebnisse mit diesem Puffer könnten daher auf die fehlende Begasung während der Lagerung zurückzuführen sein, denn eine Alkalisierung führt zu starken Schädigungen der gelagerten Organe (Nishimura et al 1998). Allerdings wurde der pH-Wert während und nach der Lagerung nicht aufgezeichnet. Eine weitere Ursache für die schlechten Resultate mit dem KHP könnte der hohe Gehalt an redox-aktiven Metallen sein (Buetter 1988, Powell, Wapnir 1994). Diese könnten in hohem Maße zur ROS-Entstehung während der Kälteinkubation und bei der anschließenden Wiedererwärmung im Organbad beitragen. Bei Lagerung in 37 °C, wie es für Zellkulturen notwendig ist, wird dieser Schädigungsmechanismus bei KHP nicht beobachtet.

Der KH-Puffer erwies sich in diesem Versuchsaufbau als unbrauchbares Medium zur längeren Kaltlagerung von Gefäßen. Auch als Transportmedium ist vom KHP abzuraten, wenn der Transport gekühlt stattfinden soll.

#### **4.2.2 UW-Lösung**

Die UW-Lösung ist heute eine der am meisten verwendeten Lösungen für die Konservierung von Abdominalorganen (Erhard et al, 1994, Global Industry Analysts, Inc., 2010). In den frühen 1980er Jahren nach den damaligen Prinzipien der Organpräservierung entwickelt, ermöglichte sie eine 24 h-Lagerung und revolutionierte damit die Transplantationsmedizin, die bis dahin Lagerungszeiten von 4 - 8 h (meist in Collins-Lösung) gewohnt war (Southard, Belzer 1995). Die UW-Lösung gehört zu den intrazellulären Lösungen mit einer hohen  $K^+$ -Konzentration (125 M) und einer niedrigen  $Na^+$ -Konzentration (29 M). Der hohen  $K^+$ -Konzentration sind adverse Effekte zuzuschreiben. So können Herzrhythmusstörungen auftreten, wenn Residuen der Konservierungslösung in großen Organen zurück bleiben (Southard 2004) Ebenso kann es zu einer Gefäßendotheldysfunktion (Mankad et al, 1991, Chan et al, 1993) und bei der Lungentransplantation zu einer Vasokonstriktion und einer erniedrigten Compliance kommen (Chien et al, 2000). Das Hauptaugenmerk liegt auf

der Verhinderung von Hypothermie-induzierten Zellschwellung. Diese verläuft, so die Annahme, über die Inaktivierung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , was zum Einstrom von Natrium- und Chloridionen führt, denen aus osmotischen Gründen Wassermoleküle folgen (Belzer et al 1988). Zur Prävention enthält die Lösung daher Lactobionat, Raffinose und HES. Lactobionat soll überdies als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator und Eisenchelator die Zellintegrität während der hypothermen Lagerung aufrechterhalten (Isaacson et al, 1989). Für die hohe Viskosität ist HES verantwortlich (Sumimoto et al, 1991, Tojimbara et al, 1997, van der Plaats 2004), welches ein schnelles Durchspülen unmöglich macht, aber eine homogenere Perfusion gewährleistet (Hardesty et al, 1993), wodurch die Perfusionsmenge reduziert werden kann (Southard, Belzer, 2004). Andererseits wird eine durch HES verursachte Erythrozytenaggregation beschrieben, die eine Stase und unvollständige Auswaschung der Konservierungslösung nach sich ziehen könnte (Morariu et al, 2003)

Die UW-Lösung enthält Glutathion als ein bei Lebertransplantationen protektiv wirkendes Antioxidans (Boudjema et al, 1990). Das zugesetzte Adenosin soll die ATP-Regeneration nach Leber- (Vreugdenhil et al, 1991) und Nieren-Präservierung (Belzer et al, 1983) stimulieren, und Allopurinol vermag über die Hemmung der Xanthinoxidase die Bildung freier Radikale zu reduzieren (Green 1989). Das Weglassen von Glutathion, Adenosin und Allopurinol führte bei hypothermer Lagerung von Rattennieren zu einer signifikanten Schädigung nach 48 h, was auf die Bedeutung des Kälte-/Reperfusionsschadens hinweist. Andererseits soll die Effektivität der UW-Lösung auch ohne HES, Dexamethason und Insulin erhalten sein (Biguzas et al, 1990).

Die UW-Lösung hat sich für viele Organe mit Konservierungszeiten von 8 oder 12 h und z.T. sogar bis zu 24 h unter anderem für Leber, Niere und Pankreas bewährt. Auch für Herztransplantationen wird die UW-Lösung verwendet (Jeevanandam et al, 1992, Wildhirt et al, 2000). Die breite Nutzbarkeit unterstreicht die klinische Bedeutung dieser Lösung, reduziert aber die Organspezifität zu Gunsten eines breiten Massenproduktes.

Die protektiven Eigenschaften der UW-Lösung sind Temperatur-abhängig, und während der Wiedererwärmung wurde eine inhärente Toxizität beobachtet (Amrani et al, 1992, Mankad et al, 1992, Ou et al, 1999). Bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit unterschiedlicher gängiger Konservierungslösungen (UW, HTK und Celsior) zeigte sich, daß bei einer Hypothermie von 4 °C lediglich die UW-

Lösung die Integrität kultivierter Hepatozyten aufrecht erhielt (Rauen und de Groot, 2007). Dieses günstige Ergebnis blieb bei 21 °C oder 37 °C aus. Bei diesen relativ hohen Temperaturen kam es als Zeichen einer Schädigung zu einem massiven LDH-Anstieg.

Die bei der Wiedererwärmung sichtbar werdende Schädigung scheint auf einem durch Kälte / Kaltlagerung induzierten, ROS-medierten Mechanismus zu beruhen (Kerkweg et al, 2002). Durch Zugabe von Eisenchelatoren konnte ein signifikanter Anteil der Schädigung vermieden werden. Einen Erklärungsansatz könnte die Zell-Impermeabilität des als Oxidationsschutz gedachten Gluthations liefern (Meister, Anderson 1984), das die ROS-induzierte Schädigung nicht verhindern kann (Rauen et al, 2000). Sogar eine Zunahme der Kälte-induzierten endothelialen Dysfunktion durch Gluthation ist beschrieben (Tambyraja et al, 2007).

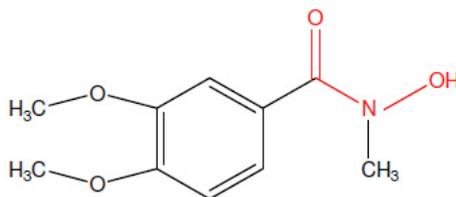
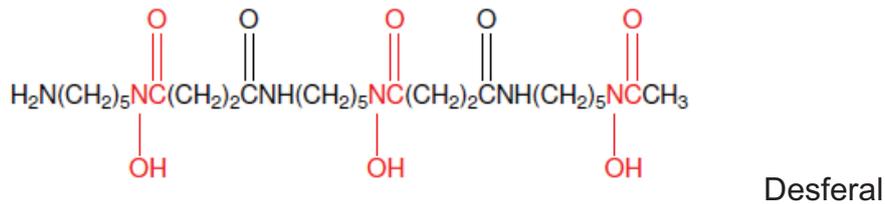
In dieser Studie ermöglichte die UW-Lösung bis 48 h ein stabiles Kontraktions- und Relaxationsverhalten, welches danach tendentiell nachlies. Bis zum Zeitpunkt 48 h sind die Ergebnisse vergleichbar mit TiPROTEC-konservierten Venen. Die UW-Lösung scheint daher bis zu 48 h empfehlenswert (Bas, 2002). Bei einer Protektion bis zu 72 h scheint die TiPROTEC-Lösung der UW-Lösung überlegen zu sein.

#### **4.2.3 TiPROTEC**

Die Entwicklung von TiPROTEC erfolgte in Stufen (Bahde et al, 2008) aus der HTK-Lösung (= Custodiol) und ist eine speziell für Gefäßkonservierung konzipierte Variante von Custodiol-N (Rauen et al, 2008), welches besonders für die Leberkonservierung entwickelt wurde. TiPROTEC wurde ausschließlich zur Vasoprotektion entwickelt, wodurch das Puffer-Volumen klein sein kann. Das Gefäßendothel ist während der Konservierung atmosphärischem Sauerstoff ausgesetzt, der sich in kaltem Medium physikalisch besser löst (Mertens et al, 1990). Eine hypoxische Schädigung spielt bei Gefäßen aufgrund der geringen Wanddicke eine geringe Rolle. Daher konnte bei der Zusammensetzung dieser Lösung größerer Wert auf andere Schädigungsmechanismen gelegt werden (s. Abb. 2). Custodiol enthält mit Histidin (Abb. 33) eine puffernde Aminosäure mit nahezu idealem pK-Wert (pK 6,2). Die Lösung hat jedoch den Nachteil, in hohen Konzentrationen die eisen-



konzentration konnte in der TiPROTEC-Lösung höher gewählt werden als in Custodiol-N, weil es sich bei Gefäßen um leicht durchspülbare, organische Gewebe mit kleiner Masse handelt und daher eine Akkumulationsgefahr nicht besteht.



**Abb. 34:** Strukturformel der beiden Eisenchelatoren in der TiPROTEC-Lösung. Die chelatisierenden Hydraxaminsäuregruppen sind rot markiert. (entnommen: Wille et al, 2008).

Weil bei kleinen Gewebemengen weniger Puffer benötigt wird, konnten Aminosäuren und Ionen den Energiehaushalt und die Osmolarität optimieren helfen. So wurde die Überlebensrate der Endothelzellen durch den Zusatz von Chlorid als Anion statt Lactobionat signifikant verbessert (Wille et al, 2008), was ältere Thesen der Kälteschädigung durch Chlorid (Belzer et al, 1988, Blankensteijn, Terpstra 1991) für Endothelzellen widerlegte. Diese günstigen Ergebnisse wurden auch für Aorten-segmente und Mesenterialarterien von Ratten bestätigt (Zatschler et al, 2009). Auch die Entscheidung zu einer hohen  $\text{K}^+$ -Konzentration widerspricht der häufig beschriebenen  $\text{K}^+$ -Toxizität (De Caterina et al, 1985; Pearl et al, 1994; Lee et al, 1996). So wurde durch Kalium als wichtigstem Kation das mitochondriale Membranpotenzial besser erhalten (Wille et al, 2008), und auch die bessere vasokonstriktorische und EDHF-medierte Relaxations-Antwort rechtfertigt die – im Gegensatz zur extrazellulär ausgerichteten Ausgangs-Lösung HTK – hohe Kaliumchlorid-Konzentration (7,3 mmol) (Zatschler et al, 2009).

Der leicht azidotische pH-Wert (= 7,0) trug zum Erhalt des mitochondrialen Membranpotenzials und der Vitalität der Endothelzellen bei. Der positive Einfluss

einer milden Azidose wurde bereits in anderen Arbeiten demonstriert (Gores et al 1989; Caldwell-Kenkel et al, 1995; Nishimura et al, 1998). Wie Histidin hat auch *N*-Acetylhistidin seine maximale Pufferkapazität im moderat azidotischen Bereich. Glukose wurde speziell als Substrat für die glykolytisch-hochaktiven Endothelzellen hinzugefügt (Mertens et al, 1990). Die Aminosäuren Glycin und Alanin bewährten sich schon bei Custodiol-*N*, indem sie in Hypoxie den  $N^+$ -Einstrom verhindern (Rauen, de Groot 2004). In der TiPROTEC-Lösung wurden sie wegen ihrer membranstabilisierenden Eigenschaften, und Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat wurden zur Aufrechterhaltung des Zitratzyklus belassen (Wu et al, 2009).

Wegen der beschriebenen Zusammensetzung ließen sich mit der TiPROTEC-Lösung bisher gute Ergebnisse erzielen. So war die Konservierung von Schweine-Aortensegmenten in dieser Lösung bis zu 21 Tagen möglich (Wille et al, 2008). Dabei zeigte sich eine signifikant verminderte Thrombozytenadhäsion gegenüber der HTK-Lösung und Perfadex. Parallel dazu war die Zahl Propidiumiodid-positiver Zellen gegenüber der HTK-Lösung, UW-Lösung, 0,9 %-NaCl-Lösung und Perfadex signifikant niedriger. Zudem war das mitochondriale Membranpotenzial als Zeichen der zellulären Integrität signifikant besser erhalten. In einer Studie an Ratten-Aortensegmenten und Mesenterialarterien war die Vasokonstriktion auf KPSS (High potassium saline solution), die Endothel-abhängige und -unabhängige Vasorelaxation, die eNOS-Expression und die Endothel-Ultrastruktur nach 4 Tagen Konservierung signifikant besser erhalten (Zatschler et al, 2009). Interessant hierbei ist, dass ein signifikanter Strukturverlust des Endothels in der HTK-Lösung schon 2 h nach Konservierung auftrat, was die Bedeutung der richtigen Lösung für das zu konservierende Organ bereits zu einem frühen Zeitpunkt unterstreicht.

In einer unveröffentlichten Studie wurde die TiPROTEC-Lösung erstmals an humaner Arteria mammaria interna getestet (Garbe et al, 2011). Die Ergebnisse sind mit den tierexperimentellen und den vorliegenden Ergebnissen vereinbar. Auch bei dieser Arterie hielt die TiPROTEC-Lösung den Vasotonus über vier Tage besser aufrecht als die HTK-Lösung, physiologische Kochsalzlösung und die 0,9-%-NaCl-Lösung. Sogar nach 10 Tagen lag die endotheliale Relaxation noch bei 50 % des Ausgangswertes, und die Funktion der glatten Muskelzellen war komplett erhalten. Auch der oxidative Stoffwechsel der konservierten Präparate war über 2 Wochen in der TiPROTEC-Lösung signifikant besser als in der HTK-Lösung, physiologischer Kochsalzlösung oder einer 0,9-%-NaCl-Lösung erhalten.

Um die Langzeitprotektion weiter zu etablieren, sollen humane Venensegmente in späteren Studien über 2 Wochen durchgeführt werden. Diese Konservierungszeit wird angestrebt, weil sie zur Durchführung mikrobiologischer Tests ausreichen würde, wie sie in den Europäischen Leitlinien und dem deutschen Gewebegesetz gefordert werden (guidelines 2004 / 23 / EC; 2006 / 17 / EC, 'Gewebegesetz', AMWHV 2007). Mit der TiPROTEC-Lösung scheint eine Gefäßtransplantatbank zur Konservierung über 1 - 2 Wochen möglich

### **4.3 Chirurgisches Trauma**

An den Ergebnissen dieser Arbeit war bemerkenswert, dass sich bei der Protektion mit der TiPROTEC-Lösung sowohl die Rezeptor-vermittelte, die nicht Rezeptor-vermittelte Kontraktionskraft als auch die Endothel-abhängige Relaxation vom ersten bis zum vierten Tag verbesserten. Dieses Phänomen ließe sich über ein chirurgisches Trauma erklären (Heusch et al, 1985).

Zu diesem Trauma könnte die Zeit gerechnet werden, welche die Venen ab der Präparation am Bein bis zur Ankunft im Labor der Experimentellen Chirurgie in NaCl-Lösung verbrachten. Diese Zeiten schwankten zwischen 10 min und 2 h. Eine Würzburger Studie zu Endothelveränderungen an Venentransplantaten zeigte, dass bereits eine 45 min Lagerung in 0,9%iger Kochsalzlösung zu einer 57 %igen Ablösung des Endothels führte (Finster, 2005). Die Ergebnisse zeigen deutlich, wie wichtig die Wahl der Lösung auch für relativ kurze Konservierungs-Zeiträume ist.

Zu einem Trauma kann ebenfalls das Vorgehen des jeweiligen Chirurgen bei der Präparation führen. Zusätzlich können das Spülen der Vene und der mit Überdruck durchgeführte Dichtigkeits-Test zu Schädigungen führen, welche für Endothel und Muskularis unterschiedlich ausfallen können.

Hohe mit einer NaCl-Lösung aufgebrachte Drücke (> 100 mmHg) führen durch die Dilatation zu einer Abrundung und Anhebung von Endothelzellen (Chester et al, 1998). Mit Drücken um 300 mmHg lassen sich Gefäße mindestens stellenweise denudieren (Chester et al, 1998). Auch der Energiehaushalt wird von der Präparation beeinflusst, denn der intrazelluläre ATP-Gehalt kann bis zu 50 % reduziert werden (Angelini et al, 1985). Diese Zellen sind zwar 'traumatisiert' aber vital, so daß bei geeignetem Milieu eine Regeneration möglich ist. Daher ist die Wahl der richtigen Konservierungslösung von Anfang an ausschlaggebend. Strittig ist, ob die zur Kurz-

zeitlagerung von Gefäßen (z.B. in der Bypass-Chirurgie) häufig verwendete 0,9 % NaCl-Lösung eine qualitativ hochwertige Präservierung gewährleisten kann.

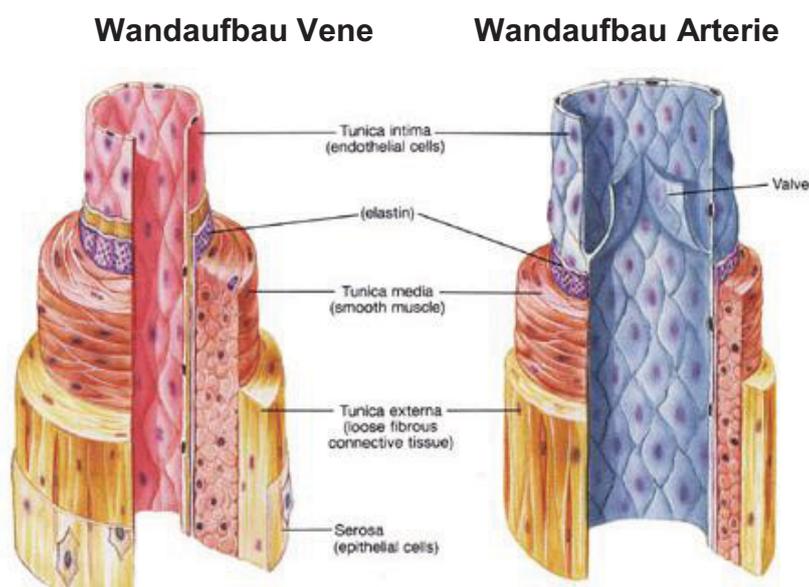
#### 4.4 Venen als Modell

Die Venae saphenae magna (VSMs) ermöglichen zweierlei Modellansichten:

- Modell eines Gefäßtransplantates. VSMs sind ein sehr beliebtes Transplantat als Rekonstruktionsmaterial für die Gefäßchirurgie, als Bypassmaterial bei kardiovaskulären Eingriffen und in der Transplantationschirurgie (Luther et al, 2004).

Die in dieser Studie verwendeten humanen VSMs wurden durch die TiPROTEC-Lösung am erfolgreichsten konserviert. Das ist in guter Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, die von Untersuchungen an Schweine-Gefäßen stammen (Wille et al, 2008) und spricht für den möglichen TiPROTEC-Einsatz in der Klinik.

- Vereinfachtes Modell eines Organs. Das gilt besonders dann, wenn die Intaktheit des Endothels funktionsbestimmend für das Organ ist. Für diese filigranen Gebilde gilt der sorgfältige Umgang im gleichen Maße wie für alle anderen in der Transplantationschirurgie eingesetzten Organe. Venen lösen ebenfalls eine Immunreaktion im Empfänger aus und bedürfen eines Schutzes vor Transplantatabstoßung.



**Abb. 35:** Wandaufbau von Vene und Arterie (entnommen: Stuart I. Fox, *Human Physiology* 4th ed, WC Brown Publishers; US).

In vielen Studien wurde der Einfluss von Konservierungslösungen auf die Morphologie von Endothelzellkulturen untersucht (von Oppell, 1990; Killinger et al, 1992). Für das vorliegende, etwas holistischere Modell war daher interessant zu untersuchen, wie sich konservierte Endothelzellen in ihrem natürlichen Verband unter dem konfokalen Lichtmikroskop präsentieren. Venen bieten hierbei gegenüber Arterien den Vorteil einer nicht ganz so prominenten Muskularis (s. Abb. 35). Durch weniger Überlagerungseffekte lässt sich die Endothelmorphologie daher besser beurteilen.

## **4.5 Untersuchungen zur Funktion**

### **4.5.1 Rezeptor-unabhängige Vasokonstriktion mit KCl**

Mit diesem Protokollschritt wurden vorgeschädigte Präparate vom Test ausgeschlossen. Es zeigte sich, daß die Rezeptor-unabhängige Kontraktion auf KCl auch eine Vorhersage über die Rezeptor-abhängige Kontraktion auf Phenylephrine ermöglichte. Das bedeutet, dass es sich um einen zuverlässigen Test zum Erhalt des Kontraktionsapparates handelt. Eine Abnahme in der Kontraktionskraft deutete auf eine Schädigung des Muskelapparates hin. Eine Aussage über den Endothelstatus wird hiermit nicht getroffen.

Durch die hohe KCl-Konzentration (80  $\mu\text{M}$ ) im Organbad wird eine Depolarisation der Zellmembran erreicht. Dadurch kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Karaki 1988, Perez et al, 2005). Die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes der Muskelzellen ermöglicht die Wechselwirkung von Aktin und Myosin und führt zur Kontraktion (Robert et al, 1979, Anderson 1978). Das Ausmaß der Amplitude der erreichten Spannung lässt auf die Menge intakter Muskelzellen und damit auf den Zustand des Organs schließen.

Einen vollkommenen Funktionsverlust erlitten die in KH-Puffer konservierten Venen im Versuchsverlauf, denn nach 72 h blieb die Antwort auf KCl aus. Dieses Ergebnis ist mit Ergebnissen anderer Studien (Grohs et al, 1996, Guo-Wei, Cheng-Qin 1995) vergleichbar, bei denen die Funktion allerdings weniger stark einbrach. Kristalloide Lösungen – wie der KH-Puffer – führten zu einer schrittweisen Abnahme der KCl-Antwort. Nach 96 h blieb die Antwort auf KCl vollkommen aus (Grohs et al, 1996).

Für in UW-Lösung konservierte Venen wurde bereits früher ein tendenzieller Abfall der Kontraktionskraft zum Zeitpunkt 72 h berichtet (Bas et al, 2002). In dieser Studie wurde die Custodiol (HTK)-Lösung) mit der UW-Lösung an Venensegmenten verglichen.

Bei der TiPROTEC-Lösung kam es bereits nach 3 h und insbesondere nach 72 h gegenüber den beiden anderen Lösungen zur größten Kraftentwicklung. In einer ähnlichen Studie wurde KPSS verwendet, um an Rattenarterien eine Vasokonstriktion auszulösen (Zatschler et al, 2009). Dabei ergab sich zum Zeitpunkt 96 h eine signifikante Überlegenheit von TiPROTEC gegenüber Custodiol. Ein zeitabhängiger Anstieg der Kontraktionskraft – wie in der vorliegenden Studie – wurde nicht beschrieben. Das kann damit zusammenhängen, dass es bei diesem Tiermodell nach der Gefäß-Präparation nicht zu unerwünschten Traumatisierungen wie Distention mit NaCl oder Lagerung in NaCl kam. Zusätzlich können sich Arterien von Ratten durchaus anders verhalten als Venen von Menschen.

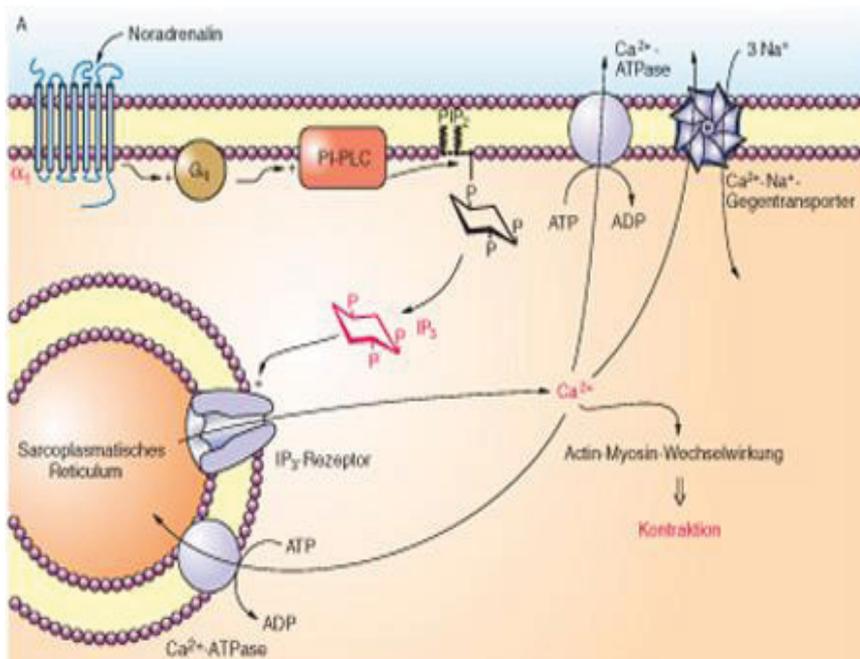
#### **4.5.2 Rezeptor-abhängige Vasokonstriktion mit Phenylephrin**

Phenylephrin (PE) ist ein  $\alpha$ -adrenerges direktes Sympathomimetikum, welches  $\alpha_1$ -spezifisch bindet und hierüber den Vasotonus beeinflusst (Drew & Whitning, 1979). Die Spezifität der Bindung ist abhängig von der PE-Konzentration. In hohen Konzentrationen können daher auch andere Rezeptoren angesprochen und 'mix subtypes' von  $\alpha_1$ -Rezeptoren angesprochen werden (Shieh et al, 2009). In Konzentrationen zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M wirkt es beispielsweise am Myokard auch über  $\beta$ -Rezeptoren (Wagner et al 1974).

Der  $\alpha_1$ -Rezeptor ist an ein Gq-Protein gekoppelt. Über eine Aktivierung der Phosphatidylinosit-spezifischen Phospholipase C verläuft die Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacylglycerin und Inosit-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) (Suematsu et al, 1984).  $IP_3$  bindet an die  $IP_3$ -Rezeptor der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums: Der zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Spiegel steigt von  $0,1 \mu M$  auf etwa  $10 \mu M$ , Aktin und Myosin können interagieren und lösen eine Kontraktion aus (van Breemen & Saida, 1989, Aktoris et al, 2005, Bevan et al, 2010). (s. Abb. 36).; Die Muskelkontraktion ist ein ATP-abhängiger Vorgang.

Die Testung durch  $\alpha$ -adrenerge Vasokonstriktoren wie PE ist eine weit etablierte Methode zur Bestimmung des Kontraktionsverhaltens (Starke et al 1995, Hussain & Marshall, 1997, Bas 2002). Eine verminderte Spannungsentwicklung gibt

einen Hinweis auf eine Schädigung des kontraktiven Apparates. Im Gegensatz zu KCl, unterliegt der Kontraktionsvorgang bei PE einem komplexen Zusammenspiel intrazellulärer Proteine. Vermutlich wird daher eine Schädigung des kontraktiven Apparates sensibler angezeigt, der Test könnte aber auch störungsempfindlicher sein (mix subtypes-Rezeptorsprache, s.o.).



**Abb. 36:**  $\alpha_1$ -Rezeptor und intrazelluläre Signaltransduktion.

PI-PLC: Phosphatidylinosit-spezifische Phospholipase C, PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat.

(Entnommen: Aktories et al, *Pharmakologie und Toxikologie*, 9.A. © Elsevier GmbH, S. 174 – 178)

Die zeitabhängige Reduktion der rezeptorvermittelten Kontraktion bei KHP-konservierten Venen ist mit Ergebnissen anderer Studien vereinbar. So betrug die Kontraktionskraft nach 36 h nur noch 31 % des Ausgangswertes (Grohs et al, 1996). Eine Studie von Cartier et al, 1995 ergab, dass physiologische Kochsalzlösung die Endothel-Funktion von Venen besser erhält als Krebs-Ringer oder autologes Blut, wobei letzteres die Kontraktionsantwort auf adrenerge Substanzen tendenzuell besser erhielt.

Bei den UW-konservierten Venen blieb der Vasotonus über alle Testzeitpunkte hinweg konstant. Eine andere Studie an Venen wies für dieselbe Konservierungslösung gegenüber HTK-konservierten Venen eine gut erhaltene, PE-induzierte Kontraktion bis zu 48 h nach (Bas, 2002).

Für die ersten 48 h ergab sich für die Venen der UW-Gruppe und die Venen der TiPROTEC-Gruppe kein signifikant unterschiedliches Kontraktionsverhalten. Das gilt gleichermaßen für die Rezeptor-unabhängige und die Rezeptor-abhängige Kontraktion. Weil TiPROTEC-konservierte Venen nach 72 h signifikant

stärker kontrahierten scheint die TiPOTREC-Lösung sich für eine längere Organprotektion zu eignen.

In einer Studie (Garbe et al, 2011) wurden humane Arterien auf den Erhalt der Kontraktionseigenschaften nach Stimulation mit Norepinephrin untersucht. Zum Zeitpunkt 96 h mit TiPROTEC-Konservierung war die Wandspannung gegenüber dem Zeitpunkt 2 h unverändert. Mit Custodiol konservierte Arterien entwickelten sowohl nach 2 h als auch nach 96 h signifikant niedrigere Wandspannungen. Auch diese Ergebnisse weisen auf die Eignung von TiPROTEC hin, Gefäße über einen längeren Zeitraum konservieren zu können. Auch wird deutlich, dass Unterschiede schon bei relativ kurzen Konservierungen entstehen.

#### **4.5.3 Endothel-abhängige Relaxation mit ACh**

Das physiologischerweise vorkommende Acetylcholin wird seit vielen Jahren in der Kreislaufforschung eingesetzt. Es gehört zu den direkten Cholinergika und verursacht wie diese durch einen Endothel-abhängigen Mechanismus sowohl eine Vasorelaxation als auch eine Hyperpolarisation in glatten Gefäßmuskelzellen (Bolten et al 1984; Chen et al, 1988; Feletou, Vanhoutte 1988; McPherson, Angus 1991). Furchgott und Zawadzki klärten 1980 das lange bekannte Paradoxon, das darin bestand, daß ACh *in vitro* vasokonstriktorisch und *in vivo* vasodilatatorisch wirkte. Die beiden bewiesen, dass die Wirkung von ACh vom Vorhandensein und der Intaktheit des Endothels abhängt, und dass ACh an intaktem Endothel einen 'endothelium-derived relaxing factor' freisetzt, welcher die dilatatorische Wirkung auslöst. Später stellte sich heraus, das EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Ignarro 1987, Palmer 1988). Ohne intaktes Endothel ist ACh ein direkter Vasokonstriktor. Der Umstand, daß ACh *in vitro* vasodilatatorisch wirkte, legt nahe, daß die untersuchten Gefäße nicht nur traumatisiert sondern erheblich geschädigt waren.

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) spaltet aus L-Arginin NO ab (Palmer et al, 1988), welches die glattmuskuläre Guanylatzyklase aktiviert, wodurch die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (3'5'-cGMP) ansteigt. Über die Phosphorylierung von an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen kommt es schließlich zum Abfall der K<sup>+</sup>-Konzentration und damit zu einer Relaxation des glatten Muskels (Rapoport und Murat, 1983; Rapoport et al, 1983).

Intaktes Endothel setzt kontinuierlich eine gewisse NO-Menge frei (Joanides et al, 1995, Anderson et al, 1995). Ein Fehlen dieses Mediators führt nicht nur zu einem Ungleichgewicht gegenüber vasokonstriktorisch wirkenden Komponenten (Bassenge, Busse, 1988) sondern auch zu einer unzureichenden Endothel-abhängigen Plättcheninhibition (Azuma et al, 1986). Kaltlagerung erhöht die Expression des von-Willebrand-Faktors und damit die Anlagerung aktivierter Thrombozyten (Upadhyya et al, 2002). Die endotheliale Dysfunktion bezeichnet die Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation aufgrund einer verminderten NO-Bioaktivität (Gimbrone 1995, Ferronia 2006). Die klinische Bedeutung wird in der Zukunft für die Pharmaindustrie steigen, denn die Arteriosklerose macht einen Großteil der Gesamtmorbidität und -mortalität in der Bevölkerung aus.

Frühpostoperative Bypass-Offenheitsraten bis 48 h werden durch den anfänglichen Endothelstatus bestimmt (Werner 1990, Fuster, Chesebro 1986). Dieser hängt wiederum vom Umgang mit dem Transplantat und dessen Präservierung ab (Szilagi 1973, Seidel 1984). Die Frühokklusionsrate venöser Bypässe bei Patienten mit einer oder mehr distalen Anastomosen beträgt im ersten Monat 21 % - 38 % (Fuster et al, 1986), wobei die Vulnerabilität des Endothels und die damit gegebene Thrombogenität einen entscheidenden Beitrag leisten (Fuster et al 1986; Perrault et al, 2007). Für die entstehende Vaskulopathie und Immunreaktion ist das aktivierte Endothel entscheidend, welches subletalen Zellschaden erlitten hat (Tilney 1999).

Das Endothel kann mit einer geeigneten Konservierung über 3 Wochen erhalten bleiben (Wille et al, 2008). Für Schweine-Aortensegmente zeigte eine mit Eisenchelatoren (Desferal und LK 614), aminosäurehaltige, N-Acetylhistidin gepufferte Basislösung, mit Kalium und Chlorid als Hauptionen ausgestattete Organ-konservierungslösung eine Reduktion nekrotischer Endothelzellen, einen Erhalt des mitochondrialen Membranpotentials und eine verminderte Thrombozytenadhäsion.

Nach 72-h Konservierung war die Relaxation der KH-Venen auf 11 % des Kontrollwertes abgefallen. Eine ähnliche Verschlechterung war bereits für das Kontraktionsverhalten beobachtet worden.

Für das gleiche Zeitfenster waren die dilatativen Eigenschaften von UW-Venen gegenüber HKT-Venen besser erhalten. Danach konnte mit ACh keine Dilatation mehr ausgelöst werden (Bas, 2002). In der eigenen Studie wiesen die UW-konservierten Venen weitgehend konstante ACh-Antworten über alle Testzeitpunkte bis zum Zeitpunkt 72 h auf

Die eigenen Ergebnisse legen die weitgehende Intaktheit des Endothels nach 72 h Konservierung in TiPROTEC-Lösung nahe. Zu diesem Zeitpunkt dilatierten die TiPROTEC-Venen gegenüber den UW-Venen nach ACh-Gabe signifikant besser. Die Ergebnisse der morphologischen Studie lassen vermuten, daß dieses gute Ergebnis auch noch nach 10 Tagen fortbestand.

#### **4.5.4 Handhabung / Wirtschaftlichkeit**

Die Handhabung von UW-Lösung und TiPROTEC-Lösung ist vergleichbar. Beides sind klare Flüssigkeiten, die bei Trübung oder sichtbaren Schwebeteilchen verworfen werden müssen. Beide Lösungen erfordern unmittelbar vor Gebrauch die Zugabe weiterer Bestandteile. Dabei scheint die Zugabe von Dexamethason (16 mg), Normalinsulin (40 IE) und Penicillin G (200.000 IE) zur UW-Lösung etwas aufwendiger als das Hinzufügen der mitgelieferten Glukose zur TiPROTEC-Lösung. Die UW-Lösung ist nach Zugabe der Additiva 24 h lang haltbar, während TiPROTEC innerhalb von 6 h zur Anwendung kommen sollte.

Die UW-Lösung ist im Vergleich mit anderen auf dem Weltmarkt etablierten Konservierungslösungen teuer. Bei Nierentransplantationen mit der UW-Lösung oder der Eurocollins-Lösung ergab sich ein Kosten / Transplantat-Verhältnis von 424 € zu 40 € (Vincentelli et al, 2003).

In einer anderen Studie wurden u.a. die Kosten der UW-Lösung mit der HTK-Lösung bei Lebertransplantationen verglichen (Erhard et al, 1994). Aufgrund der hohen UW-Viskosität wurden für Perfusion und Lagerung 6 l benötigt. Das schnelle Durchspülen mit der HTK-Lösung führte zu einem Volumen von 25 l. Zum Zeitpunkt der Studie kostete 1 l UW-Lösung 400 DM und 1 l HTK-Lösung 100 DM. Damit waren die Kosten äquivalent. In einer deutlich späteren Studie zum gleichen Thema war der Mehrverbrauch für die HTK-Lösung auf 0,6 l reduziert (UW: 3,2 l vs HTK: 3,8 l). Damit ließen sich für die Klinik jährlich Kosten in Höhe von 67.520 US\$ einsparen (Mangus et al, 2006).

TiPROTEC ist eine modifizierte HTK-Lösung mit vergleichbaren rheologischen Eigenschaften. Die Spülung und Konservierung von Gefäßtransplantaten erfordert wenig Volumen und wird vermutlich unabhängig von der jeweiligen Visko-

sität der eingesetzten Lösung sein. Da dieses Produkt erst in der näheren Zukunft erhältlich sein wird, sind die Kosten für die TiPROTEC-Lösung bisher noch nicht bekannt.

## **4.6 Untersuchungen zur Morphologie**

### **4.6.1 Methodik**

Die konfokale Lasermikroskopie wird gern und häufig zur Untersuchung zellulärer Monolayer oder dünner Gewebeschnitte eingesetzt. Es sind auch schon Untersuchungen mit Kapillaren, Schweineaortensegmenten und Ratten-Arterien veröffentlicht. Untersuchungen humaner Venen unter dem Lasermikroskop sind bislang zu kurz gekommen. Venen sind mit Endothel ausgekleidete, mit reichlich Muskel- und elastischen Fasern ausgestattete Hohlorgane, die in wässrigem Medium immer ihren natürlichen, röhrenförmigen Zustand einnehmen. Daher war das Präparat nie vollkommen eben und wellenfrei auf den Objektträger zu positionieren. Diese Störartefakte wurden in Kauf genommen, um möglichst wenig in die Homöostase der Präparate einzugreifen. Da das Präparat aus vielen Zellschichten besteht, kann man den Einfluss der Konservierungsmethode auf unterschiedliche Zellverbände gut begutachten. Mit der verwendeten Methode kann wie bei der Mikroskopie oder Lasermikroskopie die Morphologie der Zellen im Hinblick auf das Organ beurteilt werden (Zerkowski 1993, Bas 2002). Hierbei können jedoch häufig keinerlei Rückschlüsse auf die Funktion des Organs gezogen werden. Der wichtigste Vorteil der konfokalen Lasermikroskopie und des Einsatzes spezieller Vitalitäts-/Nekrosemarker gegenüber der Mikroskopie, besteht in der Möglichkeit eine Aussage darüber zu machen, ob die Zellen vital oder avital sind und ob die Integrität und Funktionsfähigkeit des Organs erhalten ist.

Zur Beantwortung der Frage wie sich die Gefäßvitalität über den Konservierungszeitraum verhält, wurden die Marker CD 141, CD 146, IgG1, VE-Cadherin, CD 31, PI und CMFDA getestet. Für die vorliegende Fragestellung hatten sich die gewählten Marker (PI und CMFDA) als beste Agenzien herausgestellt. Eine Zunahme der rotfluoreszierenden, PI-gefärbten Zellen und eine Abnahme der grünfluoreszierenden, CMFDA-gefärbten Zellen im Laufe der Konservierung, zeigte den Untergang vitaler Zellen im Präparat und ermöglichte damit eine Einschätzung der Konservierungsqualität der jeweiligen Lösung.

Auf eine Quantifizierung im Sinne einer Berechnung von Anzahl toter Zellen pro Gesichtsfeld wurde abgesehen, da die Veränderungen deutlich sichtbar waren und sich keine Konsequenz aus der Weiterführung ergeben hätten. Auf eine Färbung, speziell des Endothels, wurde nach reichlicher Testung zu Gunsten einer besseren Bildqualität verzichtet. In weiterführenden Untersuchungen könnte versucht werden, die für die Schädigungen wichtigen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) darzustellen, beispielsweise mit dem Fluorophor DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate) (Rosenkranz et al, 1992).

#### **4.6.2 Ergebnisse**

Die Eisenabhängigkeit der kälteinduzierten Schädigung von Endothelzellen wurde an Schweineaortensegmenten und unterschiedlichen Konservierungslösungen untersucht. Nach 14 tägiger Kälteinkubation und anschließender Wiedererwärmung erfolgte eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) (Wille, et al 2008). Erkennbar an der signifikanten Abnahme PI-positiver Zellen, nahm die Kälteschädigung unabhängig von der verwendeten Konservierungslösung nach Zugabe von Eisenchelatoren ab. Die TiPROTEC-Lösung enthält als einzige der getesteten Konservierungslösungen 'von Haus aus' Eisenchelatoren. Diese können die ROS-induzierte Schädigung vermindern, was den besseren morphologischen Erhalt der Struktur und den geringen Zelluntergang in der vorliegenden Studie erklären könnte.

Bei der TiPROTEC-Lösung gab es im Gegensatz zu den anderen beiden Konservierungslösungen in dieser Studie keine Auflockerung und 'Verkörnung' der Muskularis. Die Zellverbandstruktur blieb erhalten, und es wurden weniger nekrotische Zellen gefunden. Vor allem in der Endothelzellschicht zeigten sich deutlich weniger rot-fluoreszierende Zellen und damit weniger nekrotische Zellen. Präparate die mit der UW-Lösung konserviert wurden, zeigten bei gleicher Ausgangsmorphologie erheblich mehr PI-aufnehmende Endothelzellen, Myozyten und Fibroblasten nach 10 tägiger Kaltlagerung. Die Struktur der Venenwand war verwaschener und aufgelockerter als bei den TiPROTEC-Venen aber wesentlich besser erhalten als bei den KHP-Venen.

Morphologische Untersuchungen sollen die Auswirkungen verschiedener Konservierungen / Konservierungsbedingungen beurteilen helfen. Konservierungs-

lösungen entwickeln bei der Wiedererwärmung eine inhärente Toxizität (Amrani et al, 1992, Mankad et al, 1992, Ou et al, 1999). Bei der Untersuchung ergab sich für die UW-Lösung nach 4-h Lagerung mit nachfolgender Wiedererwärmung ein 81 %iger Anstieg der PI-Aufnahme als Folge einer Hepatozytenschädigung (Rauen & de Groot, 2008). Ebenfalls für die UW-Lösung wurde die kälteinduzierte Schädigung untersucht. Nach einer 1-h Wiedererwärmung zeigten sich DNA-Fragmentation, apoptotische Veränderungen und eine um das 2,5fache anstiegene PI-Aufnahme (Kerkweg et al, 2002). Diese Veränderungen konnten durch Eisenchelator-Zugabe verhindert werden (Kerkweg et al, 2002).

Die Analyse der Ultrastruktur humaner Leberbiopsien nach 12,5 h Kaltlagerung in UW-Lösung und nach kompletter Reperfusion, ergab keine Anzeichen auf einen Endothelzelltod in Kaltlagerung, wohl aber eine Aktivierung von Endothelzellen gegen Ende der Kaltlagerung und erst recht nach Reperfusion. Gleichzeitig konnte eine Kupfferzell-Aktivierung und partielle Plasmamembran-Ruptur der Endothelzellen und Vakuolisierung nachgewiesen werden (Carles et al, 1994). Diese Inflammatorische Reaktion sollte verhindert werden, um ein Transplantatversagen zu vermeiden.

Brecht et al, (1992) verglichen die PI-Aufnahme kultivierter Hepatozyten in Krebs-Henseleit-Puffer mit und ohne Begasung in Kaltlagerung. Nach 4 h kam es ohne Begasung zu einem massiven Anstieg der PI-dokumentierten Zellschädigung. In unserer Studie waren nach 10 Tagen Lagerung kaum mehr CMFDA-gefärbte, vitale Zellen erkennbar und PI-aufnehmende Zellen dominierten in allen Aufnahmeschichten. Auch schon am 1. Tag der Konservierung präsentierten sich die Venen mit leichten Veränderungen, wie einer verwaschenen Zellverbandstruktur und tendenziell höherer Zahl PI-positiver Zellen. Dies zeigt erneut, dass der KH-Puffer nicht gut zur Kaltlagerung von Gefäßen geeignet ist.

Das Ergebnis der Bildstudie ist gut mit den Resultaten der Funktionalitätsstudie in Einklang zu bringen. Eine deutlich bessere Zellmorphologie zusammen mit einem guten Kontraktions- und Relaxationsverhalten sind Ausdruck eines funktionierenden Transplantates, das bei Implantation ein minimiertes Risiko für Primärversagen und verspätete Transplantatdysfunktion birgt.

## 4.7 Zusammenfassung der Diskussion

Die speziell auf Gefäßtransplantate abgestimmte Zusammensetzung der TiPROTEC-Lösung erzielte in dieser Studie gegenüber dem KH-Puffer und der UW-Lösung die besten Ergebnisse im Hinblick auf Funktion und Morphologie. Bei der Kontraktionskraft und dem Relaxationsverhalten zeigten die in TiPROTEC-konservierten Venen im Gegensatz zu den beiden anderen Lösungen bis zum Protokollende (= 72 h nach Entnahme) eine signifikante Steigerung. Parallel dazu wurden mit der konfokalen Lasermikroskopie eine gut erhaltene Muskelzell- und Fibroblastenarchitektur und wenige PI-positive, nekrotischen Zellen über einen 10-tägigen Zeitraum nachgewiesen.

Es spricht viel dafür, TiPROTEC bei Kurzzeit- (Stunden, bis zu einem Tag) und Langzeitkonservierung (bis zu 2 Wochen) einzusetzen. Bereits nach 3 h Konservierung zeigte es signifikant bessere Ergebnisse im KCl-Kontraktionstest als der KH-Puffer oder die UW-Lösung. Daher scheint TiPROTEC auch für die kurzzeitige Protektion (z.B. bei Bypass-Operationen) gut geeignet.

Bei einer 1 - 3 tägigen Lagerung liefern die UW- und die TiPROTEC-Lösung vergleichbare Ergebnisse. Nach 4 Tagen Konservierung ist TiPROTEC deutlich überlegen.

Der klinische Stellenwert dieser Lösung bleibt bisher offen. In eine umfassende Kosten-Nutzen-Analyse sollte auch die mögliche Senkung der Reokklusions- und Reoperationsrate Eingang finden.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung.** Bei wachsendem Bedarf an Gefäßtransplantaten konnte sich eine einheitliche Konservierungsmöglichkeit bisher nicht etablieren. Insbesondere keine, die ausreichend große Konservierungszeiträume für die in den europäischen Richtlinien geforderte mikrobiologische Untersuchung dieser Transplantate bietet.

Die Vena saphena magna (VSM) ist ein beliebtes autologes und allogenes Transplantationsobjekt. Sie dient als Bypassmaterial bei kardiovaskulären Eingriffen, als Rekonstruktionsmaterial oder Patch in der Gefäßchirurgie.

Die auf dem Weltmarkt befindlichen Konservierungslösungen wurden in den frühen 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts gemäß der damaligen Auffassung der Organpräservierung entwickelt. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass sich eine kälteinduzierte Schädigung durch einen in Hypothermie (4 °C) anwachsenden redox-aktiven Eisenpool entwickelt. Dieses redox-aktive Eisen mediiert die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die zu Lipidperoxidation, Alteration der Mitochondrien und schließlich dem Zelltod führen. Die Wiedererwärmung bei Replantation potenziert diesen Mechanismus.

Eisenchelatoren können offensichtlich die Schädigungen reduzieren.

Heute übliche Konservierungslösungen, wie die hier verwendete UW-Lösung, berücksichtigen den Aspekt der kälteinduzierten Schädigung nicht. Aus der verbreiteten HTK-Lösung (= Custodiol) wurde daher eine speziell auf die Belange der Gefäßkonservierung ausgerichtete Lösung (= TiPROTEC) entwickelt, die Eisenchelatoren, N-Acetylhistidin und eine ausgewogene Menge Aminosäuren, Puffer, Elektrolyte und Glukose enthält.

Der Zustand des Gefäßendothels bei einer Organimplantation bestimmt den Langzeiterfolg der Operation.

In dieser Arbeit wurden drei Konservierungslösungen mit unterschiedlichen Konzepten der Organpräservierung untersucht. Der Erhalt der Funktionalität wurde im Organbad und der Erhalt der Vitalität mit der konfokalen Lasermikroskopie am Beispiel humaner VSMs untersucht.

**Material und Methoden.** Die Untersuchungen erfolgten an humanen Venen zu vier Zeitpunkten (nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h).

Die Venen wurden randomisiert drei Gruppen zugeteilt:

1. Krebs-Henseleit-Puffer (KHP-Gruppe) (= Kontrolle); n = 15,
2. UW-Lösung (= UW-Gruppe); n = 18,
3. TiPROTEC-Gruppe; n = 19.

Die Versuche fanden in KHP-befüllten, konstant bei 37 °C und Carbogen-begasteten Organbädern statt. Dort wurden ihre Kontraktions- und Relaxationseigenschaften untersucht.

Nach Einschluss durchliefen alle Venen das folgende Versuchsprotokoll:

1. Rezeptor-unabhängiger Kontraktion (K1) mit 80 µM KCl,
2. Reptor-abhängige Kontraktion (K2) in kumulativer Dosis bis 20 µM Phenylephrin (PE),
3. Endothel-abhängige Relaxation kumulativ bis 20 µM Acetylcholin (ACh),  
(a) Differenz vom Ausgangspunkt nach Spülen der Vorkontraktion (K2) und  
(b) als prozentuale Relaxation direkt von K2.

In einem zweiten Teil wurde die Effektivität der Konservierungslösungen auf den Erhalt der Gefäßvitalität untersucht. Hierzu wurden Venensegmente mit Propidiumiodid (PI) inkubiert zur Rotfärbung nekrotischer Zellen und CMFDA zur Grünfärbung vitaler Zellen und unter dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM510, Axiovert 100M; Zeiss, Jena) am 1. und 10. Tag anhand der Fluoreszenzzunahme analysiert.

**Ergebnisse.** Die jeweilige Konservierungslösung hatte einen großen Einfluss sowohl auf funktionelle Eigenschaften als auch auf die histo-morphologische Integrität.

**Funktion:** Der KH-Puffer erwies sich bereits für die kurzzeitige Lagerung explantierter Venen als ungeeignet. Bereits nach 3-h Konservierung war die Kontraktion auf KCl (K1) signifikant schwächer ( $20,1 \pm 3,5$  mN) als bei der TiPROTEC-Gruppe ( $41,4 \pm 16,2$  mN). Die Kontraktion in der UW-Gruppe war tendentiell besser als in der KHP-Gruppe ( $29,1 \pm 7,3$  mN).

Im PE-Test (K2) zeigte sich die Unterlegenheit des KH-Puffers erneut ( $21,0 \pm 5,2$  mN vs UW:  $46,4 \pm 13,3$  mN vs TiPROTEC:  $54,6 \pm 17,8$  mN). In der UW-Gruppe und der TiPROTEC-Gruppe stieg die Kontraktionskraft gegenüber der KHP-Gruppe nach 24 h und nach 48 h weiter an. In der TiPROTEC-Gruppe hielt dies

Zunahme auch nach 72 h an, während es bei der UW-Gruppe zu einer Kraftabnahme kam. Nach 72 h war TiPROTEC sowohl im KCl-Test ( $73,0 \pm 31,9$  mN) als auch im PE-Test ( $75,5 \pm 23,6$  mN) der UW-Lösung signifikant überlegen ( $K1 = 43,9 \pm 7,3$  mN);  $K2 = 52,4 \pm 20,6$  mN). Bei der KHP-Gruppe ergab sich eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft nach 72 h: (KCl:  $12,0 \pm 0,9$  mN und PE:  $11,03 \pm 2,3$  mN). Eine Kontraktion war bei dieser Gruppe nicht mehr auszulösen.

Im Relaxationsversuch verhielten sich die Venen analog wie bei den beiden Kontraktionsserien. Zwei unterschiedliche Auswertungen wurden durchgeführt: Bei der Differenz zwischen Ausgangswert K2 nach Spülen und der Relaxation nach  $20 \mu\text{M}$  ACh zeigte sich nach 3h in der KHP-Gruppe eine signifikant geringere Relaxationsfähigkeit (auf  $11,4 \pm 5,3$  mN vom Wert nach Spülen-erhaltener Kontraktion) als in der UW-Gruppe (auf  $27,6 \pm 9,9$  mN) und der TiPROTEC-Gruppe (auf  $38,1 \pm 15,1$  mN). Die gute Relaxation für die UW- und die TiPROTEC-Gruppe war bei 24 h weiter verbessert. In der UW-Gruppe kam es nach 72 h Konservierung zu einer leichten Abnahme der Relaxationsfähigkeit (auf  $33,4 \pm 16,7$  mN), während sich die TiPROTEC-Gruppe weiter verbesserte (auf  $63,0 \pm 21,8$  mN). Die ACh-induzierte Relaxation in der TiPROTEC-Gruppe, war nach 72 h signifikant besser als in der UW-Gruppe.

Die relativen Werte machten die signifikante Abnahme der Relaxationsfähigkeit in der KHP-Gruppe besonders deutlich (3 h:  $53,2 \pm 17,4$  % vs 72 h:  $10,2 \pm 7,8$  %) und die signifikante Zunahme in der TiPROTEC-Gruppe ( $67,7 \pm 12,7$  % bzw.  $82,5 \pm 4,3$  %). Bei den Venen der UW-Gruppe kam es zu keinen nennenswerten Änderungen ( $59,7 \pm 14,2$  % vs.  $60,8 \pm 11,1$  %).

**Morphologie:** Bereits nach 3 h Konservierung wirkte die Muskularis in der KHP-Gruppe gegenüber der UW- und der TiPROTEC-Gruppe leicht vergrößert und aufgelockert, und es fanden sich mehr PI-positive, vor allem endotheliale Zellen. Bei der UW- und der TiPROTEC-Gruppe ergaben sich für Tag 1 keine Unterschiede. Bei beiden stellen sich die Zellen vital (= grün) und klar im Zellverband dar. Am Tag 10 der Konservierung waren in der KHP-Gruppe kaum noch vitale Zellen nachweisbar. Auch der Zellverband war nicht mehr erkennbar. Stattdessen zeigten sich eine verwaschene Zellstruktur und massenhaft nekrotische Zellen. Auch bei der UW-Gruppe zeigten sich deutliche Veränderungen. Die Myozyten wirkten körniger und der Verband lockerer. Mehr Endothelzellen – aber weniger als in der KHP-Gruppe –

präsentierten sich nekrotisch. Bei der TiPROTEC-Gruppe zeigte sich keine Vergrößerung der Matrix, und die Zahl nekrotischer Endothelzellen war deutlich niedriger als in der KHP- oder in der UW-Gruppe.

Die Ergebnisse der Organbadstudie korrelieren mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie.

**Zusammenfassung und Schlussfolgerung.** Es bestehen große Unterschiede in der Qualität der Gefäßkonservierung für die drei Lösungen. Auch für kurzzeitige Lagerung explantierter Venen sollte auf KH-Puffer verzichtet werden. Die UW-Lösung zeigte auch nach 48 h Lagerung gute Ergebnisse, die sich jedoch nach 72 h leicht verschlechterten.

Die TiPROTEC-Lösung erreichte nach 24 h, 48 h und 72 h die besten funktionellen Ergebnisse. Parallel dazu waren die morphologischen Ergebnisse für Tag 1 und Tag 10 den beiden anderen Lösungen überlegen.

Die Relation zwischen vitalen und nekrotischen Zellen korrelierte mit der Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Venen in den unterschiedlich konservierten Gruppen. War die Relation hoch, dann war die Funktion gut und *vice versa*. Die TiPROTEC-Lösung zur Gefäßkonservierung erweist sich als eine gute Alternative zur Kurz- und Langzeitkonservierung in Hypothermie. Dieses gute Ergebnis lässt sich vermutlich auf die enthaltenen Eisenchelatoren zurückführen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Amrani, M., Ledingham, S., Jayakumar, J., Allen, N.J., Rothery, S., Severs, N., Yacoub, M. (1992): Detrimental effects of temperature on the efficacy of the University of Wisconsin solution when used for cardioplegia at moderate hypothermia. Comparison with the St. Thomas Hospital solution at 4 °C and 20 °C, *Circulation* 86: II 280–II 288.
2. Anderson, TJ, Uehata, A, Gerhard, MD, Meredith, IT, Knab, S., Delagrang, D, Lieberman, EH, Ganz, P, Creager, M, Yeung, AC, Selwyn, AP (1995): Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*; 26: 1235–41.
3. Andersson, K.-E. (1978): Effects of calcium and calcium antagonists on the excitation-contraction coupling in striated and smooth muscle. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*;43: 5–14
4. Angelini, GD, Breckenridge, IM, Butchart, EG, Armistead, SH, Middleton, KM, Henderson, AH, Newby, AC (1985): Metabolic damage to human saphenous vein during preparation for coronary artery bypass grafting. *Cardiovasc Res*; 19 (6): 326-334.
5. Aktoris, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer Verlag München, 9.Auflage 2005, S. 174 - 178.
6. Azuma, N. (1999) Immunosuppression with FK 506 in rat arterial allografts: Fate of allogenic endothelial cells. *J Vasc Surg* 29: 694-702.
7. Bahde, R., Palmes, D., Gemsa, O., Minin, E., Stratmann, U., de Groot, H., Rauen, U., Spiegel, H. U. (2008): Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution. *J Surg Res* 146, 49-56.
8. Bailey, L.E., Ong S.D. (1978): Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *J Pharmac Meth* 2: 171-175
9. Balzer, K., Wassmuth, r., Sandmann, W. (2006): Die femoropopliteale Rekonstruktion, Ergebnisse der allogenen Venentransplantation. *MedReport*:1;30:6.
10. Bas M. (2002): Erhaltung endothelialer und glattmuskulärer Funktionen von humanen Vena saphena magna Transplantaten. Univ. Diss. Düsseldorf.
11. Bassenge, E., Busse, R. (1988): Endothelial modulation of coronary tone. *Progr Cardiovasc Dis* 1988; 30: 349-80.
12. Bastiaanse, J, Nanhekan, LV, Slaaf, DW, Boeckx, WD, oude Egbrink, MG (2006): Preservation of rat cremaster muscle microcirculation after prolonged cold storage and transplantation. *J Surg Res* 2006;131:41-8.
13. Behrendt, D., Ganz, P. (2002): Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Applications. *Am J Cardiol*;90: 40–48.

14. Belzer, F.O., Sollinger, H.W., Glass, N.R. (1983): Beneficial effects of adenosine and phosphate in kidney preservation. *Transplantation* 36:633–35
15. Belzer, F.O., Ashby, B., Dunphy, J. (1967): 24-hour and 72-hour preservation of kidneys. *Lancet* 2: 536-538.
16. Belzer, F.O., Southard, J.H. (1988): Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*; 45:673–6.
17. Bevan, J. A., Bevan, R. D. and Duckles, S. P. 2010. Adrenergic Regulation of Vascular Smooth Muscle. *Compreh Phys.* 515–566.
18. Biguzas, M., Jablonski, P., Howden, B.O., Thomas, A.C., Walls, K., Scott, D.F., Marshall, V.C. (1990): Evaluation of Uw Solution in Rat Kidney Preservation: II. the Effect of Pharmacological Additives. *Transplantation.* 49(6):1051-1054.
19. Blankensteijn, J.D., Terpstra, O.T. (1991): Liver preservation: the past and the future. *Hepatology*; 13:1235–50.
20. Boeken, U. (1993): Cryopraeservierte, homologe Venen als Gefäßersatz zur Bein-erhaltung, Univ. Diss. Düsseldorf.
21. Bolton, T.B., Lang, R.J., Takewaki, T. (1984): Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol*, 351, 549-572.
22. Bortz, J. (1993): Statistik für Sozialwissenschaftler. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Auflage.
23. Boudjema, K., van Gulik, T.M., Lindell, S.L. (1990): Effect of oxidized and reduced glutathione in liver preservation. *Transplantation* 50:948–51.
24. Brecht, M., Brecht, C., de Groot, H. (1992): Late steady increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> preceding hypoxic injury in hepatocytes. *Biochem. J.* 283, 399-402.
25. Bretschneider, H. J., Helmchen, U., Kehrer, G. (1988): Nierenprotektion. *Klin. Wochenschrift* 66, 817-827.
26. Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Limited Dublin, Ireland (2005): MEDICINAL PRODUCT ViaSpan, Solution for Organ Preservation.
27. Buettner, G.R. (1988): In the absens of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbat as a test for catalytic metals. *J Biochem Biophys Methods* 16: 27-40.
28. Bush, H.L., Jakubowski, J.A., Curl, R., Deykin, D., Nabseth, D.C. (1986): The natural history of endothelial structure and function in arterialized vein grafts, *J Vasc Surg* 3;204–215.
29. Cai, H., Harrison, D.G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*; 87 (10):840-844.

30. Canelo, R., Hakim, N.S., Ringe, B. (2003): Experience with histidine tryptophan ketoglutarate versus University Wisconsin preservation solutions in transplantation, *Int Surg*; 88: 145.
31. Caldwell-Kenkel, J. C., Currin, R. T., Coote, A., Thurman, R. G. and Lemasters, J. J. (1995), Reperfusion injury to endothelial cells after cold storage of rat livers: protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants. *Transplant International*, 8: 77–85.
32. Campbell, P.A., McGeachie, J.K., Prendergast, F.J. (1981): Vein graft for arterial repair: their success and reasons for failure. *Ann R Coll Surg Engl*; 63: 257-260.
33. Carles, J., Fawaz, R., Hamoudi, N. E., Neaud, V., Balabaud, C. and Bioulac-Sage, P. (1994): Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion. *Liver*, 14: 50–56.
34. Carini, R., Bellomo, G., Benedetti, A. et al, (1995): Alteration of Na<sup>+</sup> homeostasis as a critical step in the development of irreversible hepatocyte injury after adenosine triphosphate depletion. *Hepatology*; 21:1089–98.
35. Cartier, R., Bouchard, D., Latulippe, J.F., Buluran, J. (1995): Effect of solutions of preservation on the vascular reactivity of human saphenous veins. *Ann Chir.* 49(8):728-34.
36. Chan, B.B., Kron, I.L., Flanagan, T.L., Kern, J.A., Hobson, C.E., Tribble C.G. (1993): Impairment of vascular endothelial function by high-potassium storage solutions. *Ann Thorac Surg*, 55, 940-945.
37. Chester, A. H., Buttery, L. D.K., Borland, J. A.A., Springall, D. R., Rothery, S., Severs, N. J., Polak, J. M., Yacoub, M.H. (1998): Structural, biochemical and functional effects of distending pressure in the human saphenous vein: implications for bypass grafting. *Coronary Artery Disease*. 9(2-3):143-151.
38. Chen, G., Suzuki, H. & Weston, A.H. (1988): Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.*, 95, 1165-1174.
39. Chien, S., Zhang, F., Niu, W., Tseng, M. T., Gray, L. Jr . (2000): Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, low-potassium dextran, And Krebs-Henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*;119:921-930
40. Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M., Terasaki, P. I. (1969): Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 2, 1219-1222.
41. Crompton, M. (2000): Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol*; 529: 11–21.

42. De Caterina, R., Weksler, B.B., Alonso, D.R., Cruz-Bracho, M.R., Subramanian, V.A. (1985): Functional endothelial damage by high-potassium cardioplegic solutions to saphenous vein bypass grafts. *Surgery*. 1985 Sep; 98(3):465-71.
43. Desagher, S., Martinou, J-C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*; 10:369–77.
44. Di Lisa, F., Canton, M., Menabó, R., (2003): Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol*; 98:235–41.
45. Dobrin, P.B., Littooy, F.N., Edean, E.D. (1989): Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery*.; 105(3):393-400.
46. Drew, G.M., Whiting, S.B. (1979): Evidence for two distinct types of postsynaptic  $\alpha$ -adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo. *Br J Pharmacol*; 67(2): 207–215. PMID: PMC2043892
47. Erhard, J, Lange, R, Scherer, R, Kox, W. J., Bretschneider, H. J., Gebhard, M.M., Eigler, F.W. (1994): Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution vs University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transpl Int.*; 7(3): 177–181.
48. Erhard, J. (1998) Organkonservierung und Organtransplantation am Beispiel der Leber, *Essener Unikat*, 10; 76-83
49. Feletou, M., Vanhoutte, P.M. (1988): Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary artery smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 93, 515-524.
50. Ferronia, P., Basilib, S., Paolettib, V., Davì, G. (2006): Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 16: 222-233
51. Finster S. (2005): Ultrastrukturelle Endothelveränderungen bei unterschiedlich konservierten Venentransplantaten - Konsequenzen für die Praxis. Dissertation; Abstract in: *J Cardiovasc Surg* 1999 40(1): 71-6.
52. Fox, Stuart I (1993) *Human Physiology* 4th ed, Brown Publishers: Dubuque, US
53. Fuckert, O., Rauen, U., de Groot, H. (2000): A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells. *Transplantation*0; 70:723–30.
54. Furchgott, R.F., Zawadzki J.V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288:373-376
55. Furchgott, R.F., Vanhoutte, P.M. (1989): Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*; 3 (9):2007-2018
56. Fuster, V., Chesebro, J.H. (1986): Role of platelets and platelet inhibitors in aorto-coronary vein-graft disease. *Circulation*; 73: 227-32.

57. Garbe,S., Zatschler,B., Müller, B., Dieterich, P., Ebner, A., Rauen, U., Matschke, K., Deussen, A. (2011): Preservation of human artery function following prolonged cold storage with a new solution, *J Vasc Surg* (not yet published, article in press).
58. Gelbfish, J., Jacobowitz, I.J., Rose, D.M. (1986): Cryopreserved homologous saphenous vein: early and late patency in coronary artery bypass surgical procedures. *Ann Thorac Surg*; 42:70-3
59. Gimbrone, M.A.Jr. (1995): Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*; 75:67B–70B.
60. Gimbrone, A., Topper, J.N. (1999): Biology of the vessel wall: endothelium. Chien KR (ed). *Mol Basis of Cardiovasc Disease*. Saunders, Philadelphia; 331–48.
61. Global Industry Analysts, Inc. (2010): Global Organ Preservation Solutions Market to Reach US\$ 48.8 Million by 2015, According to New Report by Global Industry Analysts, Inc. *Organ Preservation Solutions - A Global Strategic Business Report* (Global Industry Analysts), Healthcare and Medical San Jose, California (Vocus)
62. Gores, G. J., Nieminen, A. L., Wray, B. E., Herman, B., Lemasters, J. J. (1989): Intracellular pH during 'chemical hypoxia' in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest*. 83(2): 386–396.
63. Green, C. J., Gower, J. D., Healing, G., Cotterill, L. A., Fuller, B. J., Simpkin, S. (1989): The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Rad. Res. Comms*.7. No. 3-6, 255-264.
64. Green, D.R., Reed, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281:1309–12
65. Grohs, J G, Kadletz, M., Wodratzka, M., Wolner, E., Raberger, G. (1996): Contractile function of human veins after long-term storage in different media. *J. Cardiovasc. Pharmacology*; 28(1): 89-93
66. Guo-Wei, H, Cheng-Qin, Y. (1995): Vascular Tone and Contractility During Exposure to Cardioplegia and Hyperkalemic. *Vasc. Endovascular Surg*. 29: 261-272
67. Hardesty, R.L., Aeba, R., Armitage, J.M., Kormos, R.L., Griffith, B.P. (1993): A clinical trial of University of Wisconsin solution for pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 105: 660-666.
68. Harrison, D.G. (1997): Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol*.;20:II-11–II-17.
69. Hayry, P, Mennander, A., Raisanen-Sokolowski, A., Ustinov, J., Lemstrom, K., Aho, P., Yilmaz, S., Lautenschlager, I., Paavonen, T. (1993): Pathophysiology of vascular wall changes in chronic allograft rejection. *Transplant Rev*, 7:1-20.
70. He, G.W., Yang, C.Q. (1995): Vascular tone and contractility during exposure to cardioplegia and hyperkalemic solutions. *Vasc endovasc surg*; 29: 261

71. Heusch G, Schipke JD, Thämer V (1985) Clonidine prevents the sympathetic initiation and aggravation of poststenotic myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 7: 1176-1182
72. Hochachka, P.W. (1986): Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986; 231:234–41.
73. Hussain, M.B., Marshall, B. (1997): Characterization of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *British J. of Pharmacology*; 122 (5) 849–858.
74. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R. E., Chaudhuri G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84: 9265-9269
75. Isaacson Y, Salem O, Shepherd RE (1989): Lactobionic acid as an iron chelator: a rationale for its effectiveness as an organ preservant. *Life Sci.* 45:2373–80
76. Janssen H, Janssen PH, Broelsch CE (2004): UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl*; 10:1514-23.
77. Jeevanandam V, Auteri JS, Sanchez JA et al, 1992. Cardiac transplantation after prolonged graft preservation with the University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104:224–28
78. Jessel, S. (2008) Hannover: Jahresbericht 2007 der DGFG (Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation).
79. Joannides R, Haefeli W, Linder L (1995): Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*; 91: 1314–9.
80. Kalinowski, D.S., Richardson, D.R. (2005): The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmac Rev.* 57(4): 547-583.
81. Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H. (1988): Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca<sup>2+</sup>-tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta, *Europ J Pharmac*; 151 (2): 325-328.
82. Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., Rauen, U. (2002): Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 35:560–7.
83. Kieffer, E., Gomes, D., Chiche, L., Fléron, M. H., Koskas, F., Bahnini, A. (2004): Allo-graft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J. Vasc. Surg.* 39, 1009-1017.
84. Killinger, W.A. Jr, Dorofi, D.B., Keagy, B.A., Johnson, G.J. (1992): Endothelial cell preservation using organ storage solutions. *Transplantation*; 53:979–982.

85. Kimzey, S.L., Willis, J.S. (1971): Temperature adaptation of active sodium-potassium transport and of passive permeability in erythrocytes of ground squirrels. *J Gen Physiol*; 58: 634.
86. Kleinstreuer, C., Hyun, S., Buchanan, J.R., Longest, P.W., Archie, J.P., Truskey, G.A. (2001): Hemodynamic parameters and early intimal thickening in branching blood vessels. *Crit Rev Biomed Eng.*; 29(1):1-64.
87. Koch, A., Loganathan, S., Radovits, T., Sack, F.U., Karck, M., Szabó, G.B. (2010): Deferoxamine, the newly developed iron chelator LK-614 and N-alpha-acetyl-histidine in myocardial protection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*; 10(2):181-4.
88. Kojda, G., Harrison, D. (1999): Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.*; 43 (3):562-571
89. Krebs, H. A., Henseleit, K. (1932): Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie.* 210, 33-66.
90. Langhammer (1987) Optimierung der intraoperativen Protektion ischämischer Venentransplantate, metabol. u. morpholog. Unters. an menschl. Venen, Med. Diss. Düsseldorf
91. Laub, G.W., Muralidharan, S., Clancy, R., (1992): Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: early phase results. *Ann Thorac Surg*; 54:826-31
92. Lee, J, Drinkwater, DCJ, Laks, H, Chong, A, Blitz, A, Chen, MA, Ignarro, LJ, Chang, P (1996): Preservation of endothelium-dependent vasodilation with low-potassium University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112, 103-110.
93. Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A. (1999): Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr*; 31:305–19.
94. Ludmer, P.L., Selwyn, A.P., Shook, T.L., Wayne, R.R., Mudge, G.H., Alexander, R.W., Ganz, P. (1986): Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*; 315: 1046–51.
95. Luther, B., Balzer, K.M., Reinecke, P., Wassmuth R. , Sandmann, W. (2004): Die homologe Venentransplantation zur kruropedalen arteriellen Rekonstruktion. *Chirurg*; 75: 153-159.
96. Mangus, RS, Tector, AJ, Agarwal, A, Vianna, R, Murdock, P and Fridell, JA (2006), Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transplantation*, 12: 226–230.
97. Mankad, P., Slavic, Z., Yacoub, M. (1992): Endothelial dysfunction caused by University of Wisconsin preservation solution in the rat heart. The importance of temperature, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 104: 1618–1624.

98. Martin, D.R., Scott, D.F., Downes, G.L., Belzer, F.O (1972): Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: Cold sensitivity of the ATPase system. *Ann Surg*; 175: 111-117
99. McAnulty JF, Vreugdenhil PK, Southard JH, Belzer FO. (1990): Use of UW cold storage solution for machine perfusion of kidneys. *Transplant Proc.*; 22(2):458-9.
100. McPherson, G.A., Angus, J. (1991): Evidence that acetylcholine mediated hyperpolarization of the rat small mesenteric artery does not involve the K<sup>+</sup> channel opened by cromakalim. *Br. J. Pharmacol.*, 103, 1184-1190.
101. Meister, A., Anderson, M.E. (1984): Gluthatione. *Ann Rev Biochem*; 52: 611-50.
102. Mertens, S., Noll, T., Spahr, R., Krutzfeldt, A., Piper, H. M. (1990): Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 3: 689-94.
103. Morariu, AM., vd Plaats, A., v Oeveren, W., 't Hart, N.A., Leuvenink, H.G.D., Graaff, R., Ploeg, R. J., Rakhorst, G. (2003): Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: A risk of impaired graft perfusion in organ procurement? *Transplantation*; 76; 1; 37–43
104. Müller-Schweinitzer E., (1979): On the pharmacology of venous smooth muscle from dog and man, *Folia Haematol (Lpz.)*; 106: 690-704.
105. Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. (1999): Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc*; 31: 2069-2070.
106. Neil, D.A., Lynch, S.V., Hardie, I.R., Effeney, D.J. (2002): Cold storage preservation and warm ischaemic injury to isolated arterial segments: endothelial cell injury. *Am J Transplant*; 2:400-9.
107. Nishimura, Y., Romer, L. H. and Lemasters, J. J. (1998): Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: The pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology*, 27: 1039–1049.
108. Okadome, K, Yukizane, T, Mii, S, Sugimachi, K (1990): Ultrastructural evidence of the effects of shear stress variation on intimal thickening in dogs with arterially transplanted autologous vein grafts. *J Cardiovasc Surg*; 31(6):719-26.
109. O'Neil, G.S., Chester, A.H., Schyns, C.J., Tadjkarimi, S., Borland, J.A., Yacoub, M.H. (1994): Effect of surgical preparation and arterialization on vasomotion of human saphenous vein. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 107:699-706.
110. Orosz, C.G., Pelletier, R.C. (1997): Chronic remodeling pathology in grafts. *Current Opinion in Immunology* 9, Issue 5, 676-680
111. Ou, R., Gavin, J.B., Esmore, D.S., Rosenfeldt, F.L. (1999): Increased temperature reduces the protective effect of University of Wisconsin solution in the heart, *Ann. Thorac Surg*; 68:1628–1634.

112. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*; 333: 664-666
113. Pascual, G. (2000): The use of ischaemic vessels as prostheses or tissue engineering scaffolds after cryopreservation. *Europ J Vasc and Endovasc*; 24 (1): 23-30.
114. Pearl, J. M., Laks, H., Drinkwater, D. C., Sorensen, T. J., Chang, P., Aharon, A. S., Byrns, R. E., Ignarro, L. J. (1994): Loss of endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107, 257-264.
115. Perez J, Sanderson M, (2005) The Contraction of Smooth Muscle Cells of Intrapulmonary Arterioles Is Determined by the Frequency of Ca<sup>2+</sup>-Oscillations Induced by 5-HT and KCl; *J. Gen. Physiol.*, 125: 555–567
116. Perrault, L.P., Aubin, M.C., Malo, O., Thollon, C., Villeneuve, N., Vilaine, J.P., Vanhoutten, P.M. (2007): Status of the endothelium-derived hyperpolarizing factor pathway in coronary arteries after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*; 26: 48–55.
117. Petrat, F.; Weisheit, D.; Lensen, M.; de Groot, H.; Sustmann, R.; Rauen, U. (2002): Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem. J.*; 362:137–147.
118. Petrat, F.; de Groot, H.; Rauen, U. (2001): Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* 356: 61–69.
119. Pienaar, B.H., Lindell, S.L., Van Gulik, T., Southard, J.H., Belzer, F.O. (1990): Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation.* 49: 258.
120. Pokorny, H., Rasoul-Rockenschaub, S., Langer F. et al, (2004): Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation—a prospective multi-center observation study, *Transpl Int*; 17: 256.
121. Powell, S.R., Wapnir, R.A. (1994): Adventitious redox-active metals in Krebs-Henseleit buffer can contribute to Langendorff heart experimental results. *J Mol Cell Cardiol.*; 26(6): 769-78.
122. Rapoport, R. M., Draznin, M. B., Murad, F. (1983): Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*; 306: 174-176.
123. Rapoport, R.M. and Murad, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*; 52: 352 -357.
124. Rasch, Friese, Hofmann & Naumann (2006). *Quantitative Methoden. Band 2* (2. Auflage). Springer: Heidelberg

125. Rauen, U., Hanssen, M., Lauchart, W., Becker, H. D., de Groot, H. (1993): Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. *Transplantation*; 55: 469-473.
126. Rauen, U., Noll, T., Piper, H. M., Lauchart, W., Becker, H. D., de Groot, H. (1994): Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology*; 31: 144-153.
127. Rauen, U., Elling, B., de Groot, H. (1997): Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.*; 23: 392-400.
128. Rauen, U., Elling, B., Gizewski, E. R., Korth, H. G., Sustmann, R., de Groot, H. (1997): Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*; 22: 17-24.
129. Rauen, U., Reuters, I., Fuchs, A., de Groot, H. (1997): Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology*; 26: 351-357.
130. Rauen, U., de Groot, H. (1998): Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic. Biol. Med.*; 24: 1316-1323.
131. Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H. G., de Groot, H. (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.*; 13: 155-168.
132. Rauen, U., Petrat, F., Li, T. et al (2000) Hypothermia injury/cold-induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O<sub>2</sub>-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *FASEB J*; 14: 1953–1964.
133. Rauen, U., de Groot, H. (2002): Mammalian cell injury induced by hypothermia - the emerging role of reactive oxygen species. *Biol. Chem.*; 383: 477-488.
134. Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2003): Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.*; 35: 1664-1678.
135. Rauen, U., de Groot, H. (2004): New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J. Invest. Med.*; 52 (76): 299-309.
136. Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2004): Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 40, 607- 615.
137. Rauen, U., Kerkweg, U., Wusteman, M. C., de Groot, H. (2006): Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron: implications for corneal preservation. *Cornea*; 25: 68-77.

138. Rauen, U., Kerkweg, U., de Groot, H. (2007): Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology*; 54: 77-86.
139. Rauen, U., Klempt, S., de Groot, H. (2007): Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell. Mol. Life. Sci.*; 64: 192-205.
140. Rauen, U., de Groot, H. (2008): Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology*; 56: 88-92.
141. Rauen, U., Wu, K., Witzke, O., de Groot, H. (2008): Custodiol-N – a new, mechanism-based organ preservation solution. *Cryobiology*; 57: 331.
142. Reinhard T, Sundmacher R (1998) Die Bedeutung von Immuntherapie und HLA-Matching für die Langzeitprognose perforierender Hornhauttransplantate. *Transplant Med (Tx Med)*10: 94–96
143. Robert, S., Adelstein, M.D., David, R., Hathaway M.D. (1979) :Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction: Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle; From the Section on Molecular Cardiology, Cardiology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, Maryland USA, *The American Journal of Cardiology*; 44(5):783-7.
144. Rosenkranz, A., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K., Chen, W., Knapp, W., Zlabinger, G. (1992): A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. *J. Immun. Methods*; 156: 39-45.
145. Ross R. *Atherosclerosis* (1981): A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis*;1: 293-311.
146. Saklak M. (2004): Konservierung und Präservierung venöser Allotransplantate mit Eigenblut und Ringer-Laktat-Lösung. Experimentelle Studie an humanem Venenmaterial, Diss. Univ. Düsseldorf
147. Salahudeen, A.K., Joshi, M., Jenkins, J.K. (2001): Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation*; 72:798–804.
148. Schipke, J.D., Heusch, G., Deussen, A., Thämer, V. (1985): Acetylcholine induces constriction of epicardial coronary arteries in anesthetized dogs after removal of endothelium. *Arzneimittelforschung*. 1985; 35 (6): 926-929.
149. Schroeder, C., Heintz, A., Pexa, A., Rauen, U., Deussen, A. (2007): Preclinical evaluation of coronary vascular function after cardioplegia with HTK and different antioxidant additives. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 31, 821-826.
150. Seidel CL, Lewis RM, Bowers R et al, (1984) Adaptation of canine saphenous veins to grafting: Correlation of contractility and contractile protein content. *Circ Res*; 55: 102-9.

151. Sharon CT, G. Brett R, Philip AM. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 24; 405-412.
152. Shieh, J.P., Chu, C.C., Wang, J.J., Lin, M.T. (2009): Epinephrine, phenylephrine, and methoxamine induce infiltrative anesthesia via  $\alpha_1$ -adrenoceptors in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 30: 1227–1236.
153. Shinsuke, M., Okadome, K., Onohara, T., Yamamura, S., Sugimachi, K. (1990): Intimal thickening and permeability of arterial autogenous vein graft in a canine poor runoff model: transmission electron microscopic evidence, *Surgery*; 108: 81–89.
154. Southard, J.H., Belzer, F.O. (1995): Organ Preservation. *Annu Rev Med*; 46: 235-247.
155. Stanke F, Riebel D, Carmine S, Cracowski JL, Caron F, Magne JL, Egelhoffer H, Bessard G, Devillier P. (1998): Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation. *J Vasc Surg.*; 28(2): 273-83.
156. Steininger, R., Mühlbacher, F., Roth, E., Grünberger, T., Götzinger, P., Wamser, P., Längle, F., Reckendorfer, H., Sperlich, M. (1992) Die UW-Lösung in der Organkonservierung für die orthotope Lebertransplantation, *Acta-Chirurgica-Austria*, 24(4): 231-236.
157. Stubenitsky, B.M., Ametani, M., Danielewicz, R., Southard, J.H., Belzer, F.O. (2008): Regeneration of ATP in kidney slices after warm ischemia and hypothermic preservation. *Dept of Surgery, Univ. Hospital Maastricht, Transplant International*, 8: 293–297.
158. Suematsub, E., Hirataa, M., Hashimotob, T., Kuriyamab, H. (1984): Inositol 1,4,5-trisphosphate releases  $Ca^{2+}$  from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochemical Biophysical Res. Communications*; 120: 481-485.
159. Suchý, T, Stádler, P. (1997): Allogenic vein transplantation in vascular surgery. *Rozhl Chir* 594-597
160. Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Dohi AK. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation* 1991; 51: 589.
161. Szilagyi DE, Elliott JP, Hageman JH, Smith RF. DaU'Olmo CA. (1973) Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observation in femoro-popliteal operations of atherosclerosis. *Ann Surg* 178:232-46
162. Tachon, P., Deflandre, A. and Giacomoni, P. U. (1994) Modulation by L-histidine of  $H_2O_2$ -mediated damage of cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis* 15, 1621–1626.
163. Tambyraja, A.L., Mitchell, R., Driscoll, P.J., Deans, C., Parks, R.W., Rahman, I., Megson, I.L. (2007): Glutathione supplementation to University of Wisconsin solution causes endothelial dysfunction. *Transplant Immunology*; 18(2): 146-150.
164. Tice, D.A., Zerbino, V.R., Isom, O.W. (1976): Coronary artery bypass with freeze-preserved saphenous vein allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 71: 378-82.

165. Tilney, N.L. (1999): Chronic rejection and its risk factors. *Transplan Proc*; 31: 41S–44.
166. Tojimbara T, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R et al, (1997) Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: Influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl Surg*; 3: 39.
167. Towne, J.B. (1989) Role of fibrointimal hyperplasia in vein graft failure, *J Vasc Surg*; 10: 583–585.
168. Upadhyya, G. A., Strasberg, S. M. (2002): Platelet adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation*; 73: 1764-1770.
169. van Breemen, C., Saida K. (1989): Cellular mechanisms regulating  $Ca^{2+}$  in smooth muscle. *Annu Rev Physiol.*;51: 315-29.
170. van der Plaats, A., 't Hart, N. A., Morariu, A. M., Verkerke, G. J., Leuvenink, H. G. D., Ploeg, R. J. and Rakhorst, G. (2004), Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. *Transplant International*; 17: 227–233.
171. Vincentelli, J., Luccioni, A., Devictor, B., Dussol, B., Lechevallier, E., Bertault-Peres, P., Coulange, C., Berland, Y., Penot Ragon, C.(2003): Comparative study on two kidney graft rinsing and preservation solutions in terms of the post-transplantation risk of delayed graft function and cost. *J Clin Pharm and Ther*; 28 (4): 273–277
172. von Oppell, U.O., Pfeiffer, S., Preiss, P., Dunne, T., Zilla, P., Reichart, B. (1990): Endothelial cell toxicity of solid-organ preservation solutions. *Ann Thorac Surg*; 50: 902–910
173. Vreugdenhil, PK., Belzer, FO., Southard, JH. (1991): Adenine stimulation of adenosine triphosphate synthesis in cold-stored hepatocytes. *Transplantation*; 51:909–11
174. Wagner, J., Endoh, M. and Reinhardt, D. (1974): Stimulation by phenylephrine of adrenergic alpha- and beta-receptors in the isolated perfused rabbit heart, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 282(3): 307-310.
175. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. (1997) Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 2479–2488.
176. Wildhirt, S. M., Weis, M., Schulze, C., Conrad, N., Rieder, G., Enders, G., Ihnken, K. , von Scheidt, W., Reichart, B. (2000): Effects of Celsior and UW preservation solutions on hemodynamics and endothelial function after cardiac transplantation in humans: a single-center, prospective, randomized trial, *Transpl Int* 13(1): 203-211.
177. Wille, T., de Groot, H., Rauen, U. (2008) Essen: Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J. Vasc. Surg.*; 47: 422-431.
178. Williams, D. R. (1970) Thermodynamic considerations in coordination. Part VII. Solubility of the histidine-H<sup>+</sup> system and stability constants, free energies, enthalpies, and entropies of the protonation of histidine and tryptophan and of formation of their

- manganese(II), iron(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes. *J. Chem. Soc.*; 1: 550–555.
179. Wu, K., T.R. Türk, U. Rauen, S. Su, T. Feldkamp, H. de Groot, I. Wiswedel, H.A. Baba, A. Kribben, O. Witzke (2011): Prolonged cold storage using a new histidine-tryptophan-ketoglutarate-based preservation solution in isogeneic cardiac mouse grafts. *Eur Heart J* 32: 509–516.
  180. Wu, S., Wohlschlaeger, J., de Groot, H., Rauen, U. (2009): Evaluation of a modified HTK solution containing the new iron chelator LK 614 in an isolated rat liver perfusion model. *J Invest Surg*; 22: 340-347
  181. Zamzami, N., Kroemer, G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 67–71.
  182. Zatschler, B., Dietrich, P., Müller, B., Kasper, M., Rauen, U., Deußen, A. (2009): Improved vessel preservation after 4 days cold storage. Experimental study in rat mesenteric artery. *J. Vasc. Surg.* 50:394-406.
  183. Zezhao, H., Hongyan, X., Guoyan, Z., Jinfen, L., Huimin, H., Wenxiang, D. (2001): Analyses of thermal stress and fracture during cryopreservation of blood vessel, *Science in China*; 44: 158-163.
  184. Zerkowski, H.R. (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.
  185. Zöfel, P. (2001): *Statistik verstehen*. München: Addison-Wesley

## 7. Anhang

### Patientendatenbögen

Patientenaufkleber

Datum  
OP-NR  
Operator

**Entnahmezeit:** \_\_\_\_\_

**Nummer:** \_\_\_\_\_

**Länge:** \_\_\_\_\_

**Konservierungslösung:** \_\_\_\_\_

#### Patientendaten

Größe \_\_\_\_\_

Gewicht \_\_\_\_\_

#### Erkrankungen:

KHK

Klappenerkrankungen

HI

Herzinfarkt/Schlaganfall

Niereninsuffizienz

andere Erkrankungen:

falls Diabetiker: HBA1c-Wert \_\_\_\_\_

#### Risikofaktoren:

Rauchen

Arterielle Hypertonie

Diabetes Typ \_\_\_\_

Hypercholesterin-/Hyperlipidämie

Adipositas

#### Medikamente

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### Tests:

Test	1 (3h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)
Zeit				
Verhalten				
Sonstiges				

## Mittelwerte

**Tab. 1: Mittelwerte für alle Venen. Erläuterung: t1-4: Versuchszeitpunkte (t1 = 3h, etc.). KCl: Rezeptor-unabhängiger Test mit KCl. Phenylephrin: Rezeptor-abhängiger Test mit Phenylephrin. relax: Relaxation als Differenz von der durch den Phenylephrin-Test erreichten maximalen Kontraktion. r\_%: prozentuale Relaxation.**

	KHP			UW			TiPROTEC		
	MW	s	n	MW	s	n	MW	s	n
<b>t1_KCl</b>	19,09	3,70	15	29,34	14,36	18	40,41	14,50	19
<b>t2_KCl</b>	15,42	4,68	15	51,16	25,72	18	55,04	29,12	17
<b>t3_KCl</b>	14,00	2,55	12	57,79	30,80	14	55,61	29,75	17
<b>t4_KCl</b>	12,01	,86	9	43,90	17,29	11	73,03	31,92	12
<b>t1_PE</b>	19,05	5,12	15	45,33	21,55	18	55,66	16,81	19
<b>t2_PE</b>	17,65	5,86	15	49,80	18,24	18	70,44	32,73	17
<b>t3_PE</b>	12,70	1,13	12	54,18	17,83	14	70,96	35,03	17
<b>t4_PE</b>	11,03	2,29	9	52,41	20,56	11	75,46	23,55	12
<b>t1_relax</b>	8,73	6,44	15	26,90	15,09	18	38,28	15,07	19
<b>t2_relax</b>	5,01	4,01	15	28,23	13,34	18	53,60	32,26	17
<b>t3_relax</b>	2,22	1,39	12	34,73	18,18	14	53,12	33,20	17
<b>t4_relax</b>	1,00	,67	9	33,43	16,66	11	62,96	21,83	12
<b>t1_r_%</b>	42,79	26,12	15	57,35	15,50	18	66,94	12,41	19
<b>t2_r_%</b>	26,24	18,12	15	55,31	12,41	18	71,60	12,99	17
<b>t3_r_%</b>	17,20	9,86	12	59,47	17,12	14	69,17	15,56	17
<b>t4_r_%</b>	10,19	7,83	9	60,77	11,09	11	82,49	4,31	12

**Tab. 2:** Mittelwerte für komplette Datensätze. Erläuterung: t1-4: Versuchszeitpunkte (t1 = 3h, etc.). KCl: Rezeptor-unabhängiger Test mit KCl. Phenylephrin: Rezeptor-abhängiger Test mit Phenylephrin. relax: Relaxation als Differenz von der durch den Phenylephrin-Test erreichten maximalen Kontraktion. r\_%: prozentuale Relaxation.

	KHL			UW			TiPROTEC		
	MW	s	n	MW	s	n	MW	s	n
<b>t1_KCl</b>	20,11	3,49	9	29,08	7,31	11	41,42	16,17	12
<b>t2_KCl</b>	16,03	5,80	9	55,24	18,11	11	52,58	29,26	12
<b>t3_KCl</b>	14,31	2,76	9	64,99	31,03	11	55,47	27,99	12
<b>t4_KCl</b>	12,01	,86	9	43,90	17,29	11	73,03	31,92	12
<b>t1_PE</b>	21,00	5,24	9	46,41	13,31	11	54,58	17,84	12
<b>t2_PE</b>	18,70	7,12	9	56,21	16,66	11	64,21	28,64	12
<b>t3_PE</b>	12,77	1,03	9	59,64	15,33	11	67,40	29,72	12
<b>t4_PE</b>	11,03	2,29	9	52,41	20,56	11	75,46	23,55	12
<b>t1_relax</b>	11,36	5,26	9	27,62	9,88	11	38,06	15,06	12
<b>t2_relax</b>	5,21	4,57	9	32,51	12,67	11	48,70	30,45	12
<b>t3_relax</b>	2,18	1,58	9	39,52	16,47	11	51,17	28,30	12
<b>t4_relax</b>	1,00	,67	9	33,43	16,66	11	62,96	21,83	12
<b>t1_r_%</b>	53,22	17,41	9	59,67	14,20	11	67,72	12,73	12
<b>t2_r_%</b>	25,73	20,68	9	57,52	11,58	11	71,00	13,19	12
<b>t3_r_%</b>	16,70	11,32	9	63,20	14,13	11	71,23	14,38	12
<b>t4_r_%</b>	10,19	7,83	9	60,77	11,09	11	82,49	4,31	12

# Lebenslauf

## Verena-Constanze Buchinger-Kähler

---

Geburtsdatum: 08. Mai 1985  
Geburtsort: Bad Pyrmont  
Nationalität: Deutsch, Österreichisch  
Eltern: Dr. Andreas Buchinger (Internist,  
Naturheilverfahren) Chefarzt  
Evelyn Buchinger (Klinik Leitung)  
Adresse: Kullenhofwinkel 38, 52074 Aachen  
Telefon: +49 176 70398713  
Email: buchinger.verena@googlemail.com



## Beruflicher Werdegang

---

Seit Feb. 2011 Assistenzärztin in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie, Uniklinik Aachen, Pauwels Str. 30; Chefarzt Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Prof. h.c. mult. Norbert Pallua

## Studium

---

2010 Abschluss des Studiums, Staatsexamen der Humanmedizin im WS 2010 mit der Gesamtnote 1,6  
Aug 2009 – Aug 2010 Praktisches Jahr im Evangelischen und Johanniter Klinikum Niederrhein  
2007 - 2010 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Schipke  
Institut für Experimentelle Chirurgie (HHU)  
WS 2006 /2007 Beginn des Klinischen Abschnittes an der HHU  
SS 2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) Note 2,0  
WS 2004 / 2005 Inskription an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) für Humanmedizin

---

## Schulbildung

---

Schulabschluss: Abitur 2004, Note 1,9  
ab 1995 bis 2004 Humboldt Gymnasium Bad Pyrmont  
1991-1995 Herder-Grundschule Bad Pyrmont

## Praktika/Famulaturen

---

2010 Zwischen Schriftlicher und mündlicher Examensprüfung  
1 wöchige Hospitation in der Klinik für Plastische Chirurgie und  
Handchirurgie unter Univ.-Prof. Dr. med. Machens  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

2009 Famulatur in der Orthopädie - Praxis Dr. Schwartz Düsseldorf  
Famulatur in der Allgemein- und Gefäß-Chirurgie in Bad Pyrmont

2008 Famulatur in der Plastischen Chirurgie in der Kö-Klinik Düsseldorf

2007 / 2008 freiwillige Vorlesungsassistenz bei Prof. Dr. Gams  
(Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie UKD)

SS 2007 Famulatur in der Pädiatrie, University of Tennessee, Chattanooga, TN, USA  
Famulatur in der Herz-Thorax-Chirurgie UKD  
Famulatur in der Inneren Medizin, Gastroenterologie in Bad Pyrmont

2004 Pflegepraktikum (Chirurgie und Innere) Bad Pyrmont

## Nebenstudentische Tätigkeit

---

2008 Studentische Hilfskraft in der Kö-Klinik Düsseldorf

November 2008 Referentin zum Thema 'Erhalt der Funktionalität durch verschiedene  
Lösungen zur Organkonservierung am Beispiel der Vena saphena magna'  
XIV. kardiologisch-hämostaseologischer Workshop Solingen

WS 2007 bis WS 2008 freiwillige Vorlesungsassistenz bei Prof. Dr. Gams  
(Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie UKD)  
Tutorin für den Untersuchungskurs Gelenke  
Tutorin für den Untersuchungskurs Neurologie  
Tutorin für den Untersuchungskurs Unfallchirurgie und Rheumatologie

---

## Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und akademischen Leitbild Prof. Schipke bedanken, mit dessen Unterstützung ich jederzeit rechnen konnte. Seine wertvollen Anregungen und Fragestellungen schulten das wissenschaftliche Denken und die Freude an der Forschung.

Weiterhin möchte ich Dr. Volker Stoldt vom Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin für die Einführung in die konfokale Lasermikroskopie und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Begutachtung der Venenpräparate danken.

Für die Hilfe bei der Erstellung der Statistik und deren Auswertung danke ich Dr. Thomas Muth vom Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, der mit Geduld meine Fragen beantwortete und in dessen Büro zusammen mit Prof. Schipke interessante wissenschaftliche Diskussionen bis lange über die Bürozeiten hinaus entstanden.

Ich danke ebenfalls den Mitarbeitern des Institutes für experimentelle Chirurgie für die kompetente Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mein Studium ermöglichten, mich in meinen Entscheidungen unterstützten, mit fortwährendem Interesse an mir und meiner Arbeit. Meiner Mama möchte ich für Ihre Hartnäckigkeit und Besonnenheit danken und meinem Papa für seine wissenschaftlichen Anregungen und die Sicht für das Detail.

Danken möchte ich meinem Christian, der mir in der entscheidenden Schreibensphase die notwendige Ruhe und Sicherheit zur Erstellung dieser Arbeit gab.