

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Sandmann

**Konservierung und Preservation venöser Allotransplantate
mit Eigenblut und Ringer-Laktat-Lösung**

Experimentelle Studie an humanem Venenmaterial

D i s s e r t a t i o n

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

von

Muharrem Saklak

2004

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

Gez.:
Univ. Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab
Dekan

Referent:
Univ. Prof. Dr. Dr. B. Luther

Korreferent:
Priv. Dozent Dr. U. Sunderdiek

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 FRAGESTELLUNG	3
3 MATERIAL UND METHODEN	4
3.1 Funktionelle Studie an konservierten humanen Vv. saphenae magnae	4
3.1.1 Präparation der isolierten Venensegmente	4
3.1.2 Untersuchung der vaskulären Reaktivität isolierter Venensegmente	5
3.1.2.1 Substanzen und Lösungen	5
3.1.2.2 Versuchsaapparatur	8
3.1.2.3 Versuchsprotokoll	9
3.1.2.4 Äquilibrationphase	10
3.1.2.5 Rezeptorunabhängige Kontraktion	10
3.1.2.6 Rezeptorvermittelte Kontraktion	11
3.1.2.7 Endothelabhängige Dilatation	12
3.2 Morphologische Studie an konservierten humanen Vv. saphenae magnae	13
3.2.1 Fixation	13
3.2.2 Präparation zur Rasterelektronenmikroskopie (REM)	14
3.2.3 Untersuchung des Endothelstatus isolierter Venensegmente	15
3.3 Berechnungsverfahren und Statistik	15
4 ERGEBNISSE	16
4.1 Funktionsteste	16
4.1.1 Rezeptorunabhängige Vasokontraktion	16
4.1.2 Rezeptorabhängige Vasokontraktion	21
4.1.3 Endothelabhängige Relaxation	28
4.2 Morphologische Analyse	30
4.3 Zusammenfassung	39

5 DISKUSSION	40
5.1 Klinische Bedeutung von allogenen Venentransplantaten	40
5.2 Die klinische Bedeutung der immunologischen Abstoßungsreaktion	41
5.3 Die klinische Bedeutung des Endothels	43
5.4 Rezeptorunabhängig induzierte Vasokontraktion	45
5.5 Rezeptorabhängige Vasokontraktion	46
5.6 Endothelabhängige Vasorelaxation (EDR)	48
5.7 Morphologischer Endothelstatus	49
5.8 Verwendung anderer Konservierungslösungen	51
5.9 Blick in die Zukunft	53
6 ZUSAMMENFASSUNG	55
7 LITERATURVERZEICHNIS	57

Verzeichnis besonderer Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACH	Acetylcholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
c-GMP	Cyklisches Guanosin-5'-monophosphat
CR	Chronical rejection
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDR	Endothelabhängige Vasorelaxation
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
HTK	Histidine-Tryptophane-Ketoglutarate
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
mN	milli Newton
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PE	Phenylephrin
PTFE	Polytetrafluorethylene
REM	Rasterelektronenmikroskop
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TEA	Thrombendarteriektomie
UW - Lösung	University of Wisconsin Lösung nach BELZER
VSM	Vena saphena magna

1 Einleitung

Am Anfang des experimentellen Gefäßersatzes standen bald Venentransplantate [Carrel, 1908]. Seitdem Jean Kunlin 1948 den autologen Venenbypass in die klinische Chirurgie eingeführt hatte, wurde diese Methode in der ganzen Welt aufgegriffen, propagiert und modifiziert [Staudacher, 1973]. Körpereigene Venen haben sich bis heute als klinisch erfolgreichstes Rekonstruktionsmaterial etabliert [Anders, 1978, Ochsner, 1984, Suchny, 1997, Luther, 2002].

Dennoch ist die autologe Vena saphena magna (VSM) laut Studien in 12% bis 25% der Fälle ungeeignet [Lamm, 2001]. Um die Extremität zu erhalten, muß manchmal auf allogene Venen zurückgegriffen werden [Kniemeyer, 1998]. Obwohl an dieser Gewebetransplantation seit nahezu 50 Jahren klinisch gearbeitet wird, hat sich erst kürzlich die Erkenntnis durchgesetzt, daß auch eine allogene Vene eine relevante und unbedingt behandlungsbedürftige Antigenität besitzt.

Mit der Einleitung einer adäquaten Immunsuppression haben sich die Transplantationsergebnisse verbessert und erreichen jetzt eine längere Offenheitsrate von bis zu 80 % nach einem Jahr. Nach Abzug nicht transplantationsimmanenter Probleme liegt der Anteil von rejektionsfreien, also erfolgreichen Venentransplantationen, bei uns (Universität Düsseldorf) nach 12 Monaten sogar bei 92,9 % der Fälle.

Damit unterscheidet sich das Verfahren kaum mehr von autologen Venentransplantationen und kann klinisch bei Fehlen eigener gesunder Venen empfohlen werden [Luther, 2004].

Eine bisher ungenügend beantwortete Frage war die Konservierung und Preservation der allogenen Venen. In einer von Langhammer 1987 (Universität Düsseldorf) durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, daß außer autologem arteriellen Blut nur Konservierungslösungen mit niedrigem Gehalt an Natriumionen einen befriedigenden Erhaltungszustand gewährleisten. Die Methodik dieser Arbeit beschränkte sich aber auf die pH-Wertmessung des Endothels als Ausdruck von vitalen Stoffwechselvorgängen und einer histomorphologischen Analyse.

Bereits in den 80er Jahren wurden Versuche unternommen, durch Kryopräservierung von Spenderven die Lücke bei dem zusätzlich erforderlichen Bypassmaterial zu

schließen. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten die Erwartungen nicht erfüllen, waren doch nach kurzer Zeit die meisten dieser Prothesen wieder verschlossen.

In einer von Boeken 1993 (Universität Düsseldorf) durchgeführten Studie kam es in 50 % der Fälle zu Bypassverschlüssen und zu vielfältigen histopathologischen Veränderungen der Venensegmente wie kompletter Intimaablösungen, fibrotischer Umwandlung und Abstoßungsreaktionen [Boeken, 1993].

Die im Rahmen der Kryokonservierung auftretenden Schwierigkeiten führten in Kombination mit dem aufwendigen technischen Verfahren und den nur teilweise zufriedenstellenden Langzeitergebnissen zur Entwicklung alternativer Präservierungstechniken und zur erneuten Evaluierung allogener vaskulärer Transplantate.

2 Fragestellung

Die Verwendung postmortaler Venenpräparate spielt eine wichtige Rolle bei allogenen Gefäßtransplantationen. Während heute die antigenen Eigenschaften der Transplantate mit immunsuppressiven Methoden besser beherrschbar geworden sind, ist ihre optimale Konservierung noch Gegenstand der Forschung.

Ziel der hier vorgelegten Dissertation war die Klärung des optimalen Erhaltungszustandes und damit des günstigsten Transplantationszeitpunktes für das allogene Venentransplantat. Hierzu wurden unterschiedliche Konservierungsmedien (Autologes Blut, Ringer-Laktat-Lösung), die Lagerung des Transplantats sowie seine günstige Vorbehandlung (intraluminale Flüssigkeitsauffüllung, Seitenastligaturen) geprüft. In einem anderen Teil dieser Studie wurde die Wirkung der Konservierungsmedien UW-Belzer und HTK Brettschneider untersucht [Bas, 2002].

Methodisch ergaben sich im Rahmen der experimentellen Studie folgende Fragestellungen:

1. Beeinflusst die chemische Zusammensetzung der gewählten Konservierungslösung den Erhaltungszustand des Gefäßtransplantates?
2. Ändert sich die Vitalität des Gefäßendothels in Abhängigkeit von der verwendeten Konservierungslösung?
3. Wie verhält sich die endothelabhängige Vasorelaxation und Vasokonstriktion im zeitlichen Verlauf der Lagerung?
4. Wie ist der histomorphologische Gefäßstatus nach Lagerung in der jeweiligen Konservierungslösung in den verschiedenen Zeitintervallen?

3 Material und Methoden

3.1 Funktionelle Studie an humanen Venae saphenae magnae

3.1.1 Präparation der isolierten VSM-Segmente

Zur Präparation der isolierten humanen VSM wurden Restvenen, die im Rahmen kardiovaskulärer Operationen übrig blieben, verwandt. Eine Differenzierung der Venen nach Erkrankung des Spenders wurde nicht vorgenommen. Es konnte lediglich ein Diabetes mellitus ausgeschlossen werden.

Die Vena saphena magna wurde intraoperativ vom Chirurgen vorsichtig aus dem Bein des Patienten in einem Stück von kaudal nach kranial herauspräpariert. Dabei wurden die Abzweigungen (Venae perforantes) abgeschnitten und ligiert. Anschließend wurden die Venen in isotoner Kochsalzlösung (NaCl) zwischengelagert und vor dem Einsatz mit isotoner NaCl –Lösung durchspült, um eventuell vorhandene Perforationen auszuschliessen.

Nach erfolgreicher koronarer Bypass-Operation wurde die übrig gebliebene Restvene (i.d.R. 2-7 cm lange Segmente) in einen Plastikbehälter, der 35 ml Konservierungslösung enthielt und bei 4-8° Celsius unter Lichtprotektion gehandhabt wurde, umgelagert. Der Behälter wurde verschlossen und zum Labor für klinische Pharmakologie gebracht, wo dann die Funktionsüberprüfung nach entsprechender Konservierungsdauer von 3h, 24h, 48h, 72h sowie 96h an geeigneten Messapparaturen vorgenommen wurde. Die Lagerung der VSM-Segmente über das zu untersuchende Zeitintervall erfolgte im Labor bei 4-8° C in der entsprechenden Konservierungslösung (autologes Blut bzw. Ringer-Lösung). Zur Messung wurden die Venensegmente in täglich frisch angesetzter, modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung inkubiert.

Um noch zusätzlich den Endothelstatus histomorphologisch überprüfen zu können, wurde ein Teil des entsprechenden Venensegmentes in Glutaraldehyd fixiert und

nach Zwischenlagerung im Pathologischen Institut der Heinrich Heine Universität geblindet, elektronenmikroskopisch begutachtet.

Um eine Funktionsüberprüfung vornehmen zu können, wurde die Restvene zunächst sorgfältig aus dem Plastikbehälter entnommen und in eine Petrischale, die die entsprechende Konservierungslösung enthielt, hineingegeben. In der Petrischale wurde mit einer Schere und einer feinen Pinzette ein 3-4 mm langes Stück der Restvene abgetrennt. Dieses Venensegment wurde vorsichtig in eine ebenfalls dafür vorbereitete Petrischale hineingegeben, die 10-15 ml der bekannten Krebs-Henseleit-Pufferlösung enthielt. Hier wurde unter Feinpräparation die Vene vom umgebenden Fettgewebe gelöst, damit die Funktionsüberprüfung an geeigneten Meßapparaturen vorgenommen werden konnte.

Diese Präparation wurde bei jedem neuen Venensegment sowie zu jedem Meßzeitpunkt wiederholt.

Nach erfolgter Präparation wurde das jeweilige restliche Venensegment gekennzeichnet und im Kühlschrank bei 4-8° C unter Lichtprotektion aufbewahrt.

Während der gesamten Präparationszeit wurde zum Schutz des endothelialen Zell-Gewebes mechanischer Streß durch Dehnen, Knicken oder Zusammendrücken des Venensegmentes vermieden und darauf geachtet, dass das Gewebe zu jeder Zeit vollständig von frischem Krebs-Henseleit-Puffer umspült war.

3.1.2 *Untersuchung der vaskulären Reaktivität isolierter Venensegmente*

3.1.2.1 Substanzen und Lösungen

Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) : Der hier verwendete wurde modifiziert und in folgender Zusammensetzung angewandt :

Na ⁺	143,07 mmol/l
K ⁺	5,87 mmol/l
Ca ²⁺	1,60 mmol/l
Mg ²⁺	1,18 mmol/l
Cl ⁻	125,96 mmol/l
HCO ₃ ⁻	25,00 mmol/l
H ₂ PO ₄ ⁻	1,18 mmol/l
SO ₄ ²⁻	1,18 mmol/l
Glucose	5,05 mmol/l

Vor jedem Versuch wurde die Pufferlösung frisch angesetzt. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung von 4 konzentrierten Stammlösungen:

KH ₂ PO ₄	0,235 mol/l
KCl	0,939 mol/l
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,235 mol/l
CaCl ₂	0,320 mol/l

Für die Herstellung der benötigten 1 Liter Pufferlösung pro Versuchstag wurden folgende Substanzen eingewogen :

NaCl	6,9 g
NaHCO ₃	2,1 g
Glucose	1,1 g

Nach Zugabe von 5,0 ml jeder Stammlösung erfolgte die Verdünnung auf genau 1000 ml unter Zuhilfenahme eines Meßkolbens. Anschließend wurde 10 µM Indometacin (5,36 mg) eingewogen. Diesem wurde 1500 µl Ethanol zugegeben. Nach Durchmischung wurde dieses der Pufferlösung beigemischt. Bei Raumtemperatur wurde der Puffer mit Hilfe eines Digital- pH - Meters (Knick) auf einen Sollwert zwischen pH 7,35 – 7,45 eingestellt.

Folgend sind die Zusammensetzungen der Konservierungslösungen Ringer und Eigenblut dargestellt:

Konservierungslösung:

Ringer B|Braun

Na	147,20 mmol/l
K ⁺	4,02 mmol/l
Ca ²⁺	2,24 mmol/l
Cl ⁻	155,70 mmol/l

Autologes Eigenblut:

Na	135 – 147 mmol/l
K ⁺	4 - 4,8 mmol/l
Ca ²⁺	2,1 - 2,8 mmol/l
Cl ⁻	98 – 107 mmol/l

Zusätze zur extrakorporalen Zirkulation:

Als Füllungsvolumen: 7500 IE Liquemin
 100 – 200 ml Mannit (15%ig)
 2 – 2,5 l Jonosteril

Intraoperativ: 3mg/kg/KG Heparin

3.1.2.2 Versuchsaapparatur

Die zur Untersuchung der VSM-Segmente benutzte Apparatur bestand aus 4 einzelnen Organbad - Meßstationen (s. Abb. 1), deren Kernstück ein doppelwandiger, 25ml fassender Glaskolben war. Der in diese Zellen eingefüllte Krebs-Hensleit-Puffer wurde durch Glasfritten mit Carbogengas (Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) versorgt und durch eine temperierbare Wasserversorgung der Doppelwände mittels Umlaufthermostat / Wasserbad Kombination auf 37°C gehalten.

Ein gleichkonstruierter Zylinder mit einem Fassungsvermögen von 2000ml diente als Reservoir für frischen, auf 37° C vorgewärmten Puffer.

Die präparierten 3-4mm langen VSM-Ringe wurden vorsichtig ohne Berührung der Innenfläche auf 2 Edelstahlelemente aufgezogen und so fixiert, daß das untere an einem Haken einer Haltestange, und das obere Element über einen feuchtstabilen Polyesterfaden direkt mit einem isometrischen Druckabnehmer (Statham, USA) verbunden war.

Die dort registrierten Signale des Gefäßtonus wurden über einen Verstärker (Institutseigenbau, Herr Dipl.-Ing. J. Springer) auf einem digitalen Punktdrucker (LPD12, Linseis, Selb) registriert.

Das verwendete Instrumentarium bestand aus mehreren Scheren, Federschere, Pinzetten, Pipetten, einem Skalpell, mehreren Petrischalen, Spritzen mit Kanülen sowie Korkplatten (zum Fixieren der Venensegmente in Glutaraldehyd). Weiterhin wurden allgemeine Einrichtungen des Labors wie Waagen, pH-Meter, die Destillieranlage sowie Kühlschrank verwendet. Zum Einhängen der Gefäßringe ins Organbad wurden triangelförmige Haken aus Edelstahl (10-7-10 mm) benutzt. Die Verbindung zwischen Haken und Spannungsabnehmer wurde mittels eines Fadens (Synthofil® grün, Braun, Melsungen) hergestellt.

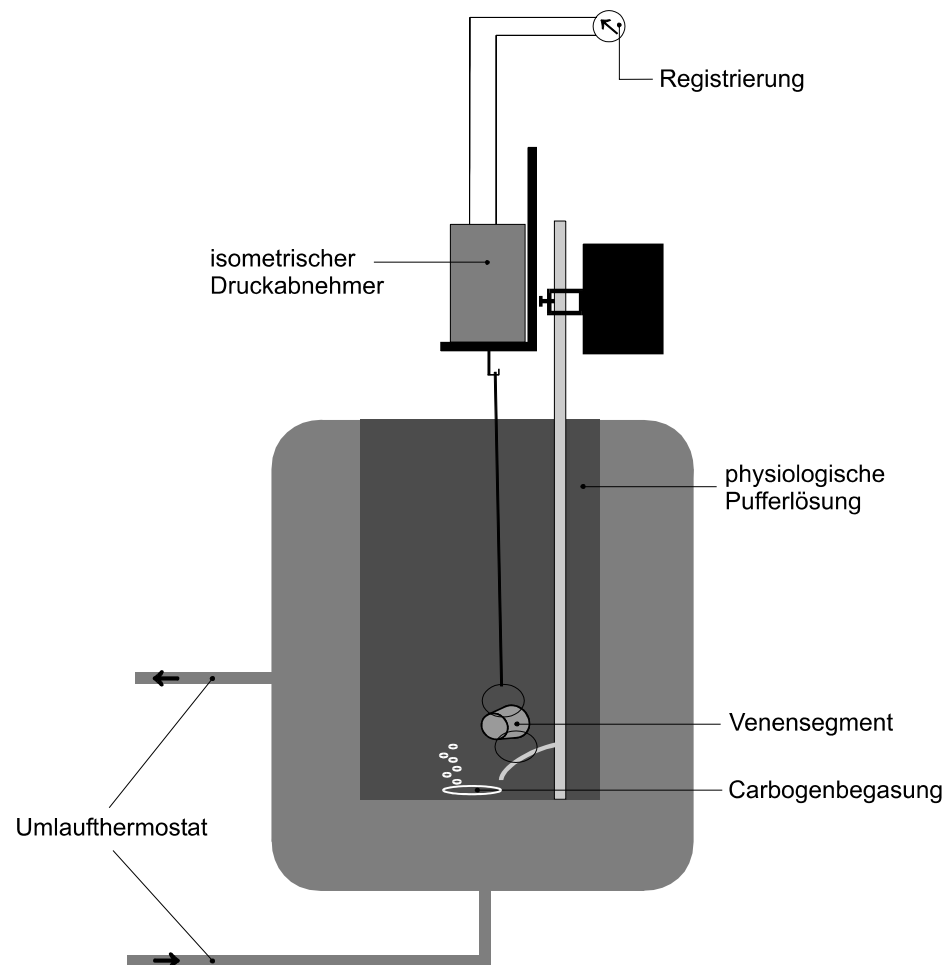


Abb. 1: Aufbau einer Organbadapparatur mit eingespanntem Venensegment. Die Messung der Gefäßspannung erfolgte isometrisch (Spannungsentwicklung ohne merkliche Veränderung der Muskellänge).

3.1.2.3 Versuchsprotokoll

Die Organbadapparatur wurde vor jedem Versuch neu äquilibriert, damit die Standardisierung der einzelnen Versuche gewährleistet war. Dazu erfolgte nach dem Spannungsabgleich (Nullwerteneinstellung) der 4 Meßkanäle eine Kalibrierung des Meßsystems. Durch Belastung des Spannungsmessers mit Kontrollgewichten von

genau 1,0 g wurde das Meßsystem voreingestellt, wobei die Spannung einem Schreibausschlag von 1 cm entsprach.

Dieser Arbeitsschritt ermöglichte eine spätere Bestimmung der Kraftentwicklung in Gramm bzw. Newton. Nach einem erneuten Spannungsabgleich wurden die Eichgewichte entfernt und die VSM-Ringe eingespannt. Durch Anspannung des Fadens bis zur Nullwerteinstellung des Schreibers war dann die Ruhespannung der VSM-Ringe auf 1g eingestellt, ein Gewicht, welches in den Vorversuchen gute reproduzierbare Kontraktionen lieferte. Es wurde dabei insbesondere darauf geachtet, dass die auf 2 Triangeln aufgespannten VSM-Segmente unter größtmöglicher Schonung der Intima aufgezogen wurden und ohne mechanische Behinderung frei beweglich waren. Die Venensegmente blieben über den gesamten Versuchsablauf in den konstant auf 37° C temperierten, mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten und mit Carbogen begasten Organbädern.

3.1.2.4 Äquilibrierungsphase

In der Äquilibrierungsphase wurden die VSM-Ringe für ca. 30 min. bis zur Stabilisierung eines Ruhetonus unter der eingestellten Vorspannung belassen. Die Pufferlösung wurde in Intervallen von 10 min. gegen frischen, begasten und vorgewärmten Puffer ausgetauscht. Dabei musste nach jedem Waschvorgang die Einstellung des Nullwertes neu vorgenommen werden.

Die Organbäder wurden mittels Aspiration des Puffers durch ein Metallrohr (ca. 2 mm Lumen), auf das ein Vakuum gelegt war, entleert. Anschließend konnte mit einer Messpipette frischer, begaster, und vorgewärmter Puffer überführt werden.

Der Waschvorgang wurde zügig durchgeführt. Dieses erfolgte ohne Berührung der eingespannten Gefäßstücke.

3.1.2.5 Rezeptorunabhängige Kontraktion

Zur Überprüfung der Funktionalität der Gefäßabschnitte erfolgte initial zu Beginn eines Versuches die Überprüfung des Kontraktionsverhaltens (Abb. 2).

Durch Zugabe von Kaliumchlorid in einer Einzeldosis von 80 mM wurde das Kontraktionsverhalten nach Depolarisation ermittelt. Im Anschluß daran wurde wie in den späteren Untersuchungen, zunächst eine Auswaschung des Organbades sowie eine Äquilibrationsphase vorgenommen. Dieser Kontraktionstest wurde zu den verschiedenen Meßzeitpunkten von 3h, 24h, 48h, 72h, sowie 96h mit der gleichen Restvene wiederholt.

Venensegmente, die trotz Wiederholung nicht auf rezeptorunabhängige Kontraktion reagierten, wurden verworfen und aus der Wertung ausgeschlossen.

3.1.2.6 Rezeptorvermittelte Kontraktion

Zur Kontrolle der α_1 -rezeptorvermittelten Kontraktion wurde mit wechselnden und steigenden Dosen von Phenylephrin (PE) stimuliert.

Als Initialdosis wurde 0,2 μ M PE verabreicht. Anschließend erfolgte eine Steigerung auf 2 μ M P sowie 20 μ M PE.

Nach maximaler Konzentrations-Wirkungs-Kurve der jeweiligen Dosis wurde das Organbad aspiriert, ausgewaschen und mit frischem Puffer versetzt. Es folgte eine Äquilibrationsphase von 10 min. Dieser Kontraktionstest wurde mit der gleichen Restvene zu verschiedenen Meßzeitpunkten wiederholt.

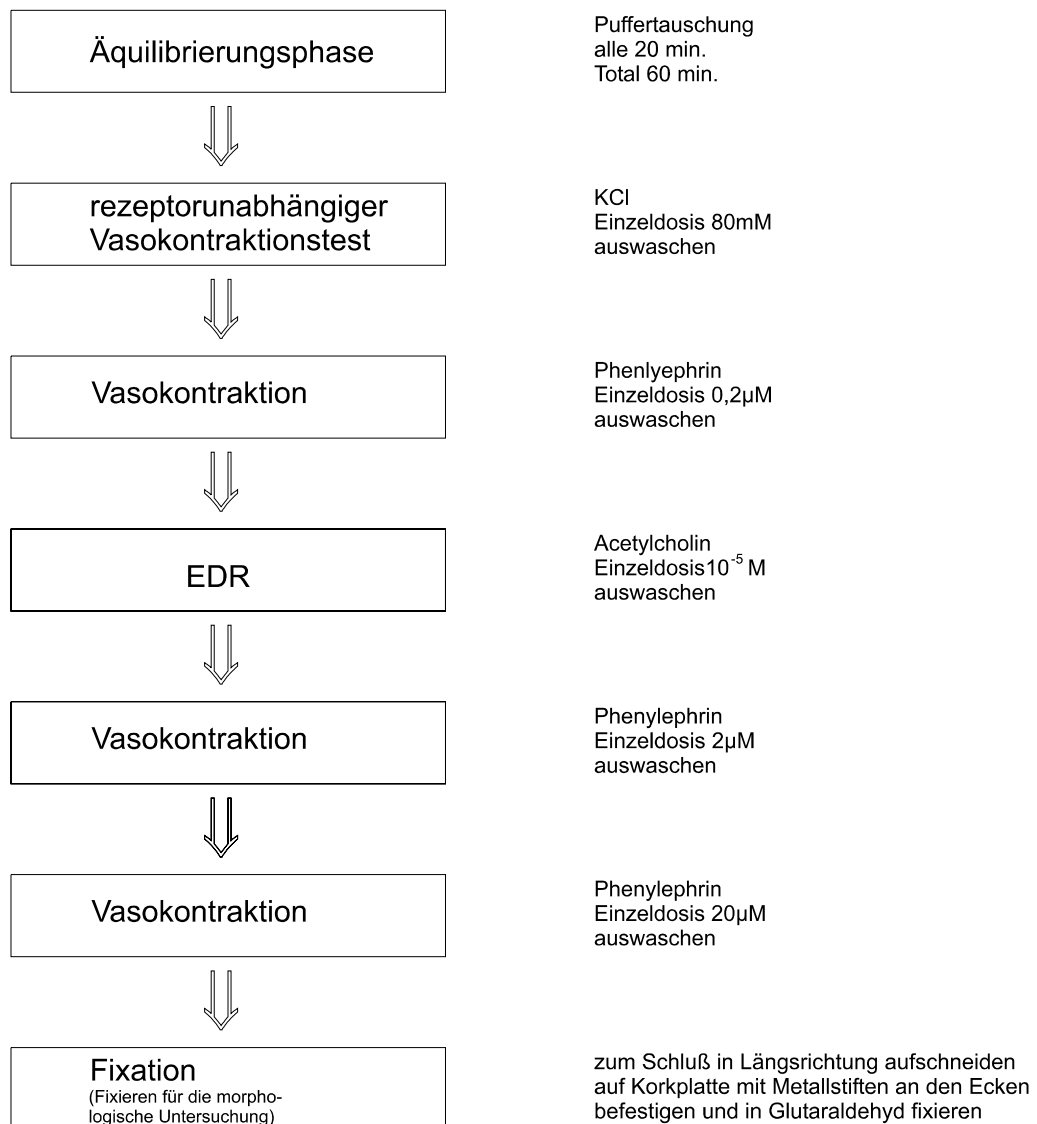


Abb. 2: Schematisches Versuchsprotokoll der Organbadversuche mit Konzentrationsangaben der erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK).

3.1.2.7 Endothelabhängige Dilatation (EDR)

Nach einer Vorkontraktion durch Gabe von 0,2µM Phenylephrin sollte das Endothelverhalten anhand einer Wirkungskurve durch einmalige Gabe von 10^{-5} M Acetylcholin (ACH) bestimmt werden (Abb. 2).

Das Ausmaß der endothelabhängigen Relaxation (EDR) ist abhängig von der Intaktheit des Gefäßendothels.

Dadurch können quantitative Aussagen über eine Funktionsveränderung des Endothels gemacht werden. Nach maximaler Wirkungskurve wurde das Organbad aspiriert, ausgewaschen und mit frischem Puffer versetzt, wonach auch eine neue Äquilibrationsphase erfolgte.

3.2. *Morphologische Studie an humanen Venae saphena magna*

3.2.1 Fixation

Das tiefgefrorene, 2,5 %ige Glutaraldehyd, das sich in einem verschlossenen 10 ml Behälter befand, wurde bei Raumtemperatur aufgetaut.

Während dieser Zeit wurde das Venensegment, welches zuvor aus dem Organbad herausgenommen wurde, in einer mit 50 ml Krebs-Henseleit Puffer gefüllten Petrischale für die Fixation vorbereitet. Das Lumen des Venenstückes wurde sorgfältig mit einer feinen Schere in Längsschnitttrichtung eröffnet und auf einer Korkplatte vorsichtig an zwei Ecken mit Hilfe kleiner Metallstifte fixiert. Dabei war es insbesondere wichtig, iatrogene Endothelverletzungen zu vermeiden.

Diese auf Korkplatten (1,5 x 1,5 cm) gespannten Venenstücke wurden umgehend in die mit Glutaraldehyd gefüllten Glasbehälter hineingegeben und gekennzeichnet, um sie dann bei 4-8° C im Kühlschrank zu lagern.

Die fixierten und gekennzeichneten VSM-Stücke wurden zum Pathologischen Institut der Heinrich Heine Universität gebracht. Dort wurden sie in einem Kühlhaus gelagert, bis alle VSM-Stücke zur vollständigen histologischen Untersuchung und Begutachtung mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) vorlagen.

3.2.2 Präparation für das Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Präparation wurde durch eine medizinisch technische Assistentin des pathologischen Instituts der Heinrich-Heine Universität zu Düsseldorf durchgeführt. Dabei wurden folgende Arbeitsschritte getätigt:

- Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd (0,1 M Cacodylatpuffer)
- Spülen in Cacodylatspüllösung (2 x 15 min.)
- Nachfixierung in 1%igem Osmium (2h)
- Spülen in Cacodylatspüllösung (2 x 15 min.)
- Jeweils für eine Stunde in 50, 60, 70, 80, 90%igem und absolutem Alkohol spülen
- Jeweils für 15 min. in 25, 50, 75%igem Aceton/Alkoholgemisch spülen
- 3mal für jeweils 15 min. in absolutem Aceton spülen
- Critical-Point-Trocknung durchführen
- Proben auf Probenhalter mit Leitsilber aufkleben
- Sputtercoating durchführen (=Goldbedampfung)

Ansätze:

0,2 M Cacodylatpuffer

auf 2000 ml A.d. kommen 8,5622 g Cacodylatsäure-Natriumsalz
($C_2H_6AsNaOH \times 3H_2O$) pH mit 1N HCl auf 7,4 einstellen

Cacodylatspülpuffer

0,2 M Cacodylatpuffer 1:1 mit A.d. verdünnen und pro 100 ml Spüllösung 7,53 g Saccharose zugeben

1%iges Osmium

1 g OsO_4 auf 100 ml 0,1 M Cacodylatpuffer (ohne Saccharosezusatz)

3.2.3 Untersuchung des Endothelstatus isolierter Venensegmente

Nach entsprechender Vorbehandlung und Präparation wurden aus den Gefäßsegmenten - mittels eines Mikrotoms - feine Gewebsschnitte hergestellt. Diese wurden auf einen Objektträger übertragen, anschließend mit einem Rasterelektronenmikroskop begutachtet und photographiert. Dadurch konnten Gefäßwände sowie Endothelstatus beurteilt werden.

Die mikroskopische Untersuchung und Begutachtung erfolgte im Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, nach den Kriterien einer Blindstudie: Die histopathologische Untersuchung wurde ohne Kenntnis des Lagerungsmediums des zu beurteilenden Präparates durchgeführt.

Dabei wurden folgende Begutachungskriterien festgesetzt :

- kein Endothel erkennbar
- vereinzelt Endothel vorhanden
- Endothel großflächig vorhanden
- Endothel vollständig erhalten

3.3 Berechnungsverfahren und Statistik

Die Ergebnisse der Messungen der rezeptorvermittelten sowie der rezeptor-unabhängigen Vasokontraktion sind angegeben als arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die Anzahl der durchgeführten Versuche, die den Mittelwerten zugrunde liegen, ist mit n bezeichnet.

Alle Daten wurden durch eine Varianzanalyse (Two Way Anova) auf signifikante Unterscheidung getestet, wobei als Voraussetzung für einen statistisch abgesicherten Unterschied ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt wurde. Alle statistischen Analysen wurden EDV gestützt durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionsteste

Wir haben in der vorliegenden Studie von insgesamt 43 Vena saphena magna-Präparaten 25 geeignete Venen konserviert und untersucht. In Ringer-Laktat-Lösung wurden 12 Venen und in Eigenblut aus der Herz-Lungen-Maschine wurden 13 Venen konserviert.

4.1.1 Rezeptorunabhängige Vasokontraktion

Von den 17 in Ringer gelagerten Restvenen gingen $n = 12$ in die Auswertung ein. Die fünf restlichen Venensegmente reagierten weder initial auf rezeptorunabhängige Kontraktion mit 80 mM KCl, noch bei einem Kontrollversuch und wurden definitionsgemäß verworfen.

Tab. 1: Rezeptorunabhängige Kontraktion durch KCl für Ringer-Lösung

Lagerung [h]	Gefäßspannung [mN] mit $\pm$ SEM		n
3	34,6211	$\pm 4,2737$	12
24	23,0535	$\pm 3,8650$	12
48	17,8052	$\pm 3,1898$	12
72	7,8034	$\pm 0,9931$	11
96	2,8449	$\pm 0,4557$	11

Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion durch 80 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktion [mN] der Gefäßringe, die in Ringer-Lösung über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden. n gibt die Anzahl der untersuchten Gefäßringe an.

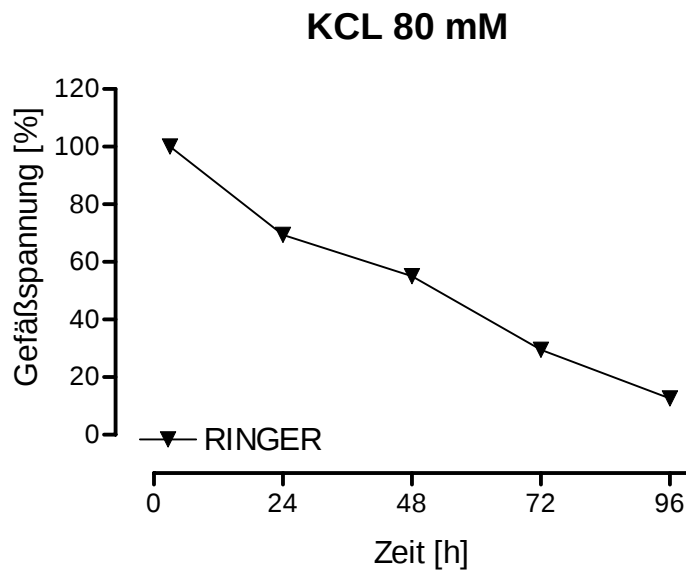


Abb. 3: Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion durch 80 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktion [in %] der Gefäßringe, die in Ringer-Lösung über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden.

Tab. 2: Rezeptorunabhängige Kontraktion durch KCl für Eigenblut

Lagerung [h]	Gefäßspannung [mN] mit $\pm$ SEM		n
3	35,3840	$\pm 7,3632$	13
24	31,3920	$\pm 4,6092$	12
48	29,1030	$\pm 4,9938$	12
72	25,9961	$\pm 5,0243$	12
96	22,1166	$\pm 4,5906$	11

Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion durch 80 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktion [mN] der Gefäßringe, die im autologen Blut über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden. n gibt die Anzahl der untersuchten Gefäßringe an.

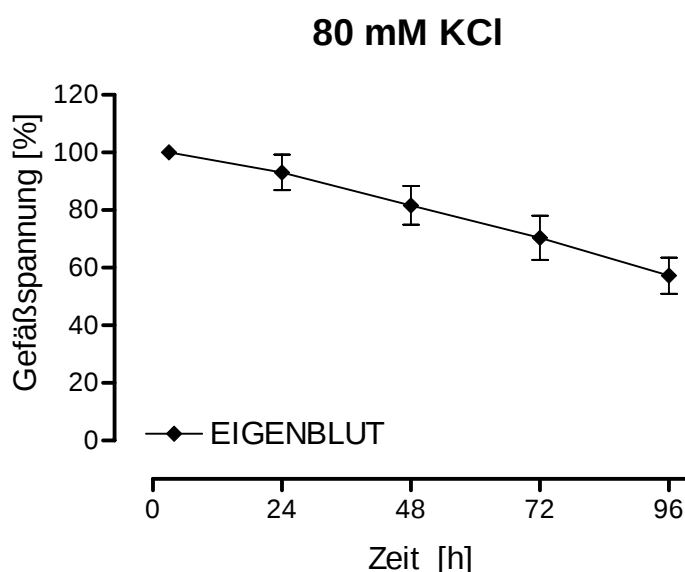


Abb. 4: Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion durch 80 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktion [in %], die im autologen Blut über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden.

Die Daten aus Tab. 1 (Ringer-Lösung) sowie Tab.2 (Autologes Blut) zeigen, daß die rezeptorunabhängig induzierte Vasokontraktion initial vergleichbar war. Nach 72h nahm die Vasokontraktion in Ringer-Lösung signifikant ab, während sich im Eigenblut die kontraktile Antwort auf KCl nicht signifikant verringerte. Dieses Ergebnis ist in den Dosis-Wirkungs-Kurven der Abb. 3 (Ringer-Lösung) und Abb. 4 (Autologes Blut) dargestellt.

Nach 96 h sank die kontraktile Antwort auf $8,22 \pm 16,10$ % signifikant bei den Venen in Ringer ab, und auf $62,45 \pm 20,79$ % bei den Eigenblut-Venen ($p < 0,0001$).

Die im autologen Blut gelagerten Restvenen zeigten insbesondere signifikante Kontraktionsunterschiede ab dem 3. sowie 4. Konservierungstag im direkten Vergleich zu den Venensegmenten, die in Ringer-Lösung gelagert wurden.

Die Venen reagierten auf KCl-Zugabe mit einer verstärkten Kontraktionsantwort bei vergleichbarer n-Zahl.

Bei einer direkten Gegenüberstellung der Konservierungsmedien Ringer-Laktat

und autologes Blut ergab sich ein signifikanter Unterschied beider Konservierungslösungen im Hinblick auf den Erhaltungszustand der Gefäßspannung - trotz ähnlicher Initialkontraktionen. Nach einer statistischen Analyse mittels Two-Way-Anova konnte festgestellt werden, dass sowohl die Konservierungslösung ($P < 0,0014$), als auch die Gefäßspannung hinsichtlich der Konservierungszeit ($P < 0,0001$) sich signifikant unterscheiden. In Eigenblut ließ sich im Vergleich zu Ringer-Lösung selbst nach 96 h eine fast 5-fach höhere, rezeptorunabhängige Kontraktion nachweisen (Tab. 3).

Tab. 3: Rezeptorunabhängige Kontraktion: Ringer-Lösung vs. Eigenblut

RINGER			EIGENBLUT		
Lagerungszeit [h]	Gefäßspannung [mN]	n	Gefäßspannung [mN]	n	
3	34,6211 ±4,2737	12	35,3840 ±7,3632	13	
24	23,0535 ±3,8650	12	31,3920 ±4,6092	12	
48	17,8052 ±3,1898	12	29,1030 ±4,9938	12	
72	7,8034 ±0,9931	11	25,9961 ±5,0243	12	
96	2,8449 ±0,4557	11	22,1166 ±4,5906	11	

Rezeptorunabhängig induzierte Kontraktion durch 80 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktion [mN] der Gefäßringe, die im autologen Blut und in Ringer-Lösung über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden.

Die initial durch KCl (80mM) ausgelöste Vasokontraktion in mN war zwischen Eigenblut (35,3840 $\pm$ 7,3632 mN, n=13) und Ringer-Lösung (34,6211 $\pm$ 4,2737 mN, n=12) vergleichbar.

Nach 72h nahm die Vasokontraktion in der Ringer-Lösung (7,80 $\pm$ 0,99 mN, n= 11) gegenüber Eigenblut hinsichtlich der Lagerungszeitsignifikant ab, während sich im

Eigenblut ($25,99 \pm 5,02$ mN, $P=0,0001$, $n=12$) die kontraktile Antwort auf KCl nicht signifikant verringerte ($73,41 \pm 20,02$ %, $n=12$). Die kontraktile Antwort im Intervall nach 96 h der Venen in Ringer-Lösung sank in der Varianzanalyse von Ringer-Lösung zu autologem Blut gegenüber diesem signifikant ab ($p < 0,0001$). In Prozent betrugen die Zahlen für die Venen in der Ringer-Lösung 22,54 % respektive 73,41 % für die Venen in autologem Blut. Über die gesamte Konservierungszeit hinweg blieb die kontraktile Antwort der in Eigenblut gelagerten Venen deutlich über der Antwort der in Ringer-Lösung gelagerten Venen.

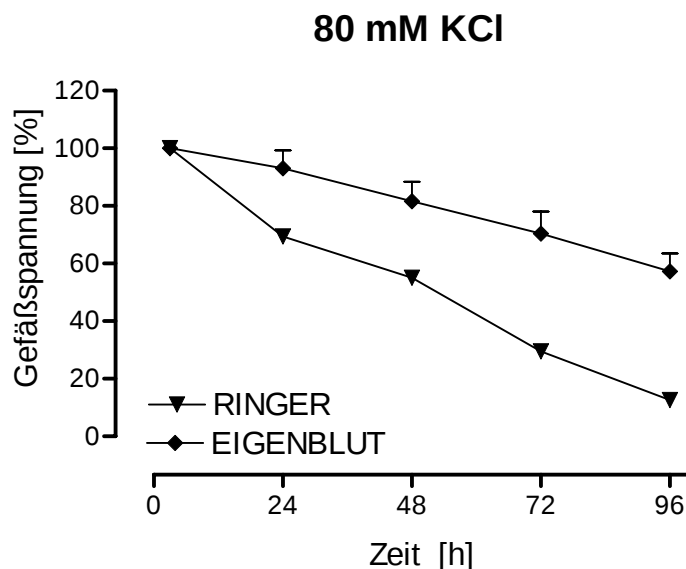


Abb. 5: Abbildung stellt rezeptorunabhängig induzierte Kontraktionen durch 80 mM KCl dar, wobei die Gefäßspannung der ersten 3 Stunden mit 100% festgelegt wurden. Berücksichtigt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Vasokontraktionen in [%] der Gefäßringe, die im autologen Blut und in Ringer-Lösung über Meßzeitpunkte [h] gelagert wurden. In der Varianzanalyse (ANOVA) ergab sich sowohl hinsichtlich der Konservierungslösungen ($p < 0,0014$), als auch der Konservierungszeit ($p < 0,0001$) ein signifikanter Unterschied.

4.1.2 Rezeptorabhängige Vasokontraktion

Nach initialer α_1 -rezeptorabhängiger Vorkontraktion mit 0,2 μM Phenylephrin, sowie daran anschließendem Endothel-Relaxationstest wurde die Gabe von Phenylephrin kumulativ auf 2 μM und 20 μM Phenylephrin gesteigert. Untersucht wurden hierbei 13 Venensegmente. Dieser Kontraktionstest wurde über alle Versuchszeitpunkte hinaus für beide Konservierungslösungen durchgeführt.

Nachdem für die jeweilige Preservationslösung sowie die jeweilige Phenylephrin-Konzentration die Gefäßspannung in Millinewton ermittelt wurde, konnten diese gegeneinander aufgetragen und verglichen werden.

Tab. 4: Gefäßspannungen kumulativer Phenylephrin-Dosen für Ringer-Lösung

Lagerungs- zeit [h]	Gefäßspannung [mN] für 0,2 μM	Gefäßspannung [mN] für 2 μM	Gefäßspannung [mN] für 20 μM	Anzahl n
3	9,5157 $\pm$ 2,4525	17,8419 $\pm$ 4,6974	26,6832 $\pm$ 4,8069	12
24	6,8670 $\pm$ 2,0601	10,6126 $\pm$ 0,8953	23,6421 $\pm$ 4,4145	11
48	4,2183 $\pm$ 1,7658	9,3641 $\pm$ 0,7045	19,5216 $\pm$ 3,8259	11
72	1,8639 $\pm$ 0,7848	4,2807 $\pm$ 0,7744	11,2815 $\pm$ 3,8259	11
96	0,1962 $\pm$ 0,1962	2,4525 $\pm$ 0,6161	6,3765 $\pm$ 2,7468	11

Dargestellt sind die Gefäßspannungen [mN] mit den dazu gehörenden Mittelwerten ($\pm$ SEM) und den jeweiligen kumulativen Phenylephrin-Dosen (0,2, 2, 20 μM). Die Werte stehen in Bezug zu der jeweiligen Konservierungszeit [h], in der die Gefäßringe in Ringer-Lösung gelagert wurden.

Einfluß von Ringer auf die kontraktile Aktivität

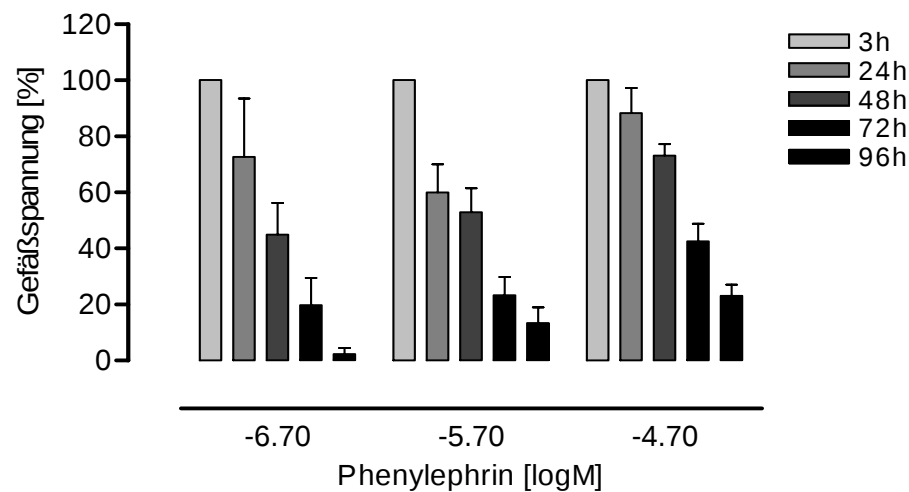


Abb.6: Dargestellt sind die Gefäßspannungen [%] mit den dazu gehörenden Mittelwerten ($\pm$ SEM) und den jeweiligen kumulativen Phenylephrin-Dosen [logM]. Die Werte stehen in Bezug zu der jeweiligen Konservierungszeit [h], in der die Gefäßringe in Ringer-Lösung gelagert wurden.

Tab. 5: Gefäßspannungen kumulativer Phenylephrin-Dosen für Eigenblut

Lagerungs-zeit [h]	Gefäßspannung [mN] für 0,2 μ M	Gefäßspannung [mN] für 2 μ M	Gefäßspannung [mN] für 20 μ M	Anzahl n
3	5,1012 $\pm$ 0,9810	15,9526 $\pm$ 4,9152	34,4331 $\pm$ 12,0663	13
24	5,6898 $\pm$ 1,0791	10,6929 $\pm$ 2,8667	43,5564 $\pm$ 14,6169	13
48	3,4335 $\pm$ 0,8829	7,7273 $\pm$ 1,5888	38,2590 $\pm$ 11,1834	13
72	2,8449 $\pm$ 0,7848	4,6820 $\pm$ 1,3544	32,5692 $\pm$ 13,4397	11
96	0,6867 $\pm$ 0,3924	2,4971 $\pm$ 0,8534	25,8984 $\pm$ 11,0853	11

Dargestellt sind die Gefäßspannungen [mN] mit den dazu gehörenden Mittelwerten ($\pm$ SEM) und den jeweiligen kumulativen Phenylephrin-Dosen (0,2, 2, 20 μ M). Die Werte stehen in Bezug zu der jeweiligen Konservierungszeit [h], in der die Gefäßringe im autologen Blut gelagert wurden.

Einfluß von Eigenblut auf die kontraktile Aktivität

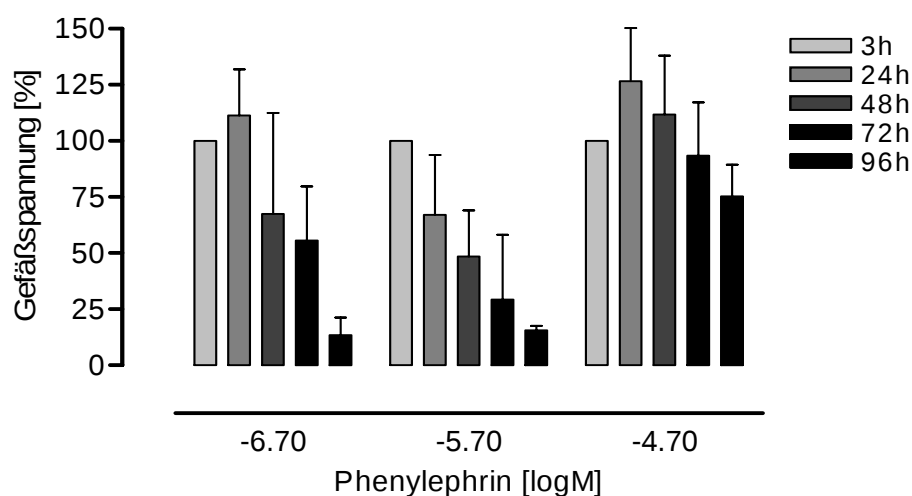


Abb. 7: Dargestellt sind die Gefäßspannungen [%] mit den dazu gehörenden Mittelwerten ($\pm$ SEM) und den jeweiligen kumulativen Phenylephrin-Dosen [logM]. Die Werte stehen in Bezug zu der jeweiligen Konservierungszeit [h], in der die Gefäßringe in Eigenblut gelagert wurden.

Bei der α_1 -rezeptorvermittelten Vasokontraktion wurden kumulativ verschiedene Konzentrationen von Phenylephrin zu bestimmten Konservierungszeiten gemessen, um die Auswirkung der Lagerungszeit sowie der Lagerungslösung auf die Funktion der jeweiligen Venensegmente festzustellen.

Dabei nahmen die in [mN] gemessenen Vasokontraktionen - über die Zeit - ab.

Beim Vergleich der Venenpräparate in Ringer-Lösung zu denen im autologen Blut - in Bezug auf die α_1 -adrenerge Vasokontraktion bei 0,2 μ M PE - fällt auf, dass die glattmuskuläre Reaktion auf PE in beiden Lösungen ähnlich ist.

Bei 2 μ M PE ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) bei beiden Lösungen auch über die gesamte Lagerungszeit vergleichbar. Stimuliert man die Venensegmente mit 20 μ M PE, so ergeben sich höhere Kontraktionsraten (in mN) für die in Eigenblut gelagerten Venen. Es läßt sich abschließend ein Vorteil für Eigenblut als Konservierungslösung verzeichnen. Der Funktionsverlust der in

autologem Blut konservierten Venensegmente fällt geringer aus als der, der bei in Ringer-Lösung konservierten Venen feststellbar ist.

Der initiale Vasotonus durch 0,2 μ M Phenylephrin bei der Ringer-Lösung ($9,52 \pm 2,45$ mN, $n=12$) und im Eigenblut ($5,10 \pm 0,98$ mN, $n=13$, $p=0,099$) war vergleichbar (Abb. 12). Nach 72h Konservierung sank die Vasokontraktion für Ringer-Lösung auf $1,86 \pm 0,78$ mN, für Eigenblut in der vergleichbaren Zeit auf $2,84 \pm 0,78$ g ab. Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der beiden benutzten Konservierungslösungen. Tab. 6 gibt die kontraktile Antwort der Gefäßringe zum jeweiligen Meßzeitpunkt in mN wieder.

Tab. 6: Gefäßspannungen bei 0,2 μ M PE-Dosis für Eigenblut/Ringer

Eigenblut			Ringer	
Zeit [h]	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n
3	$5,1012 \pm 0,9810$	13	$9,5157 \pm 2,4525$	12
24	$5,6898 \pm 1,0791$	13	$6,8670 \pm 2,0601$	11
48	$3,4335 \pm 0,8829$	13	$4,2183 \pm 1,7658$	11
72	$2,8449 \pm 0,7848$	11	$1,8639 \pm 0,7848$	11
96	$0,6867 \pm 0,3924$	11	$0,1962 \pm 0,1962$	11

Die initiale Vasokontraktion betrug in Ringer-Lösung nach Applikation von 2 μ M Phenylephrin $17,84 \pm 4,70$ mN ($n=12$) und im Eigenblut $15,95 \pm 4,91$ mN ($n=13$). Nach 96h sank die Vasokontraktion in Ringer auf $2,45 \pm 0,62$ mN ($n=11$), verglichen mit $2,50 \pm 0,85$ mN ($n=11$) in Eigenblut (Abb. 9). Auch hier ist kein statistisch signifikanter Unterschied beider Lösungen gegen die gemessenen Zeitintervalle zu ermitteln. Die Gefäßspannungen der VSM-Stücke sind in beiden Lösungen vergleichbar (Tab.7).

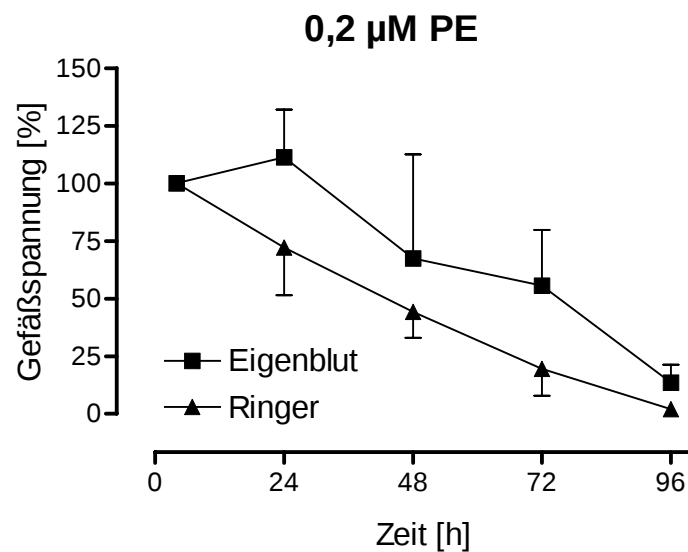


Abb. 8: Dargestellt ist die Vasokontraktion für Ringer- und Eigenblut-Venen in Prozent gegen den jeweiligen Messzeitpunkt bei 0,2 μ M PE.

Tab. 7: Gefäßspannungen bei 2 μ M PE-Dosis für Eigenblut/Ringer

Eigenblut			Ringer	
Zeit [h]	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n
3	15,9526 $\pm$ 4,9152	13	17,8419 $\pm$ 4,6974	12
24	10,6929 $\pm$ 2,8667	13	10,6126 $\pm$ 0,8953	11
48	7,7273 $\pm$ 1,5888	13	9,3641 $\pm$ 0,7045	11
72	4,6820 $\pm$ 1,3544	11	4,2807 $\pm$ 0,7744	11
96	2,4971 $\pm$ 0,8534	11	2,4525 $\pm$ 0,6161	11

Die initiale Vasokontraktion bei 20 μ M Phenylephrin betrug für Eigenblut $34,43 \pm 12,07$ mN (n=13) und für Ringer-Lösung $26,68 \pm 4,81$ mN (n=12). Nach 72h sank die Vasokontraktion in Ringer-Lösung auf $11,28 \pm 3,83$ mN (n=11), verglichen mit $32,57 \pm 13,44$ mN (n=11) in Eigenblut (Abb. 13).

Die Kontraktion sank nach 96 h für Ringer-Lösung auf $6,38 \pm 2,75$ mN und für Eigenblut auf $25,90 \pm 11,09$ mN. In Tab. 8 ist die prozentuale Gefäßspannung der jeweiligen Venensegmente (mit SEM) gegen die Zeit dargestellt. Bei der höchsten PE-Konzentration ist nach 96 h eine deutlich höhere kontraktile Antwort der Eigenblut - Venen festzustellen. Der Gesamtvergleich bei $20\mu\text{M}$ PE ist in Abb. 10 dargestellt.

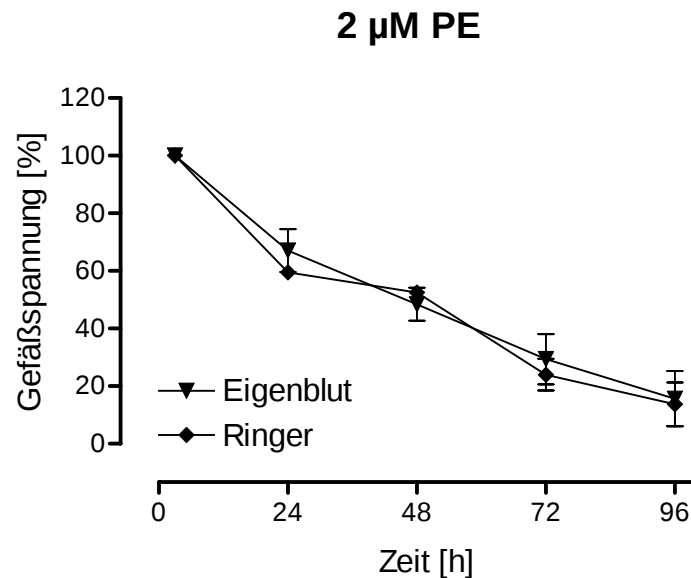


Abb. 9: Dargestellt ist die Vasokontraktion für Ringer- und Eigenblut-Venen in Prozent gegen den jeweiligen Messzeitpunkt bei $2\mu\text{M}$ PE.

Tab. 8: Gefäßspannungen bei $20\mu\text{M}$ PE-Dosis für Eigenblut/Ringer

Eigenblut			Ringer		
Zeit [h]	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n	Kontraktion [mN] mit $\pm$ SEM	n	
3	$34,4331 \pm 12,0663$	13	$26,6832 \pm 4,8069$	12	
24	$43,5564 \pm 14,6169$	13	$23,6421 \pm 4,4145$	11	
48	$38,2590 \pm 11,1834$	13	$19,5216 \pm 3,8259$	11	
72	$32,5692 \pm 13,4397$	11	$11,2815 \pm 3,8259$	11	
96	$25,8984 \pm 11,0853$	11	$6,3765 \pm 2,7468$	11	

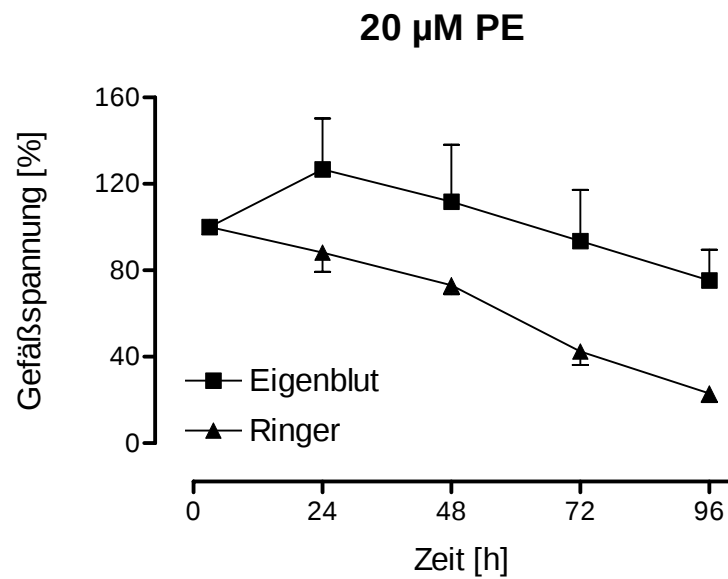


Abb. 10: Dargestellt ist die Vasokontraktion für Ringer- und Eigenblut-Venen in Prozent gegen den jeweiligen Meßzeitpunkt [h] bei 20 μ M PE.

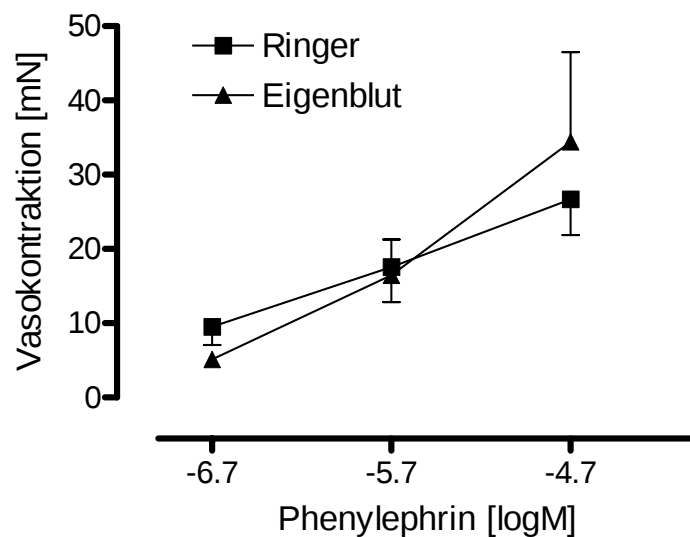


Abb. 11: Dargestellt ist die Auswirkung der kumulativen Phenylephrin-Dosissteigerung auf die Vasokontraktion (mN) und Ihre dosisabhängige Veränderung in den jeweiligen Konservierungslösungen nach der initialen Konservierungszeit von 3h.

4.1.3 Endothelabhängige Relaxation

Die endothelabhängige Relaxation wurde nach einer Vorkontraktion mit $0,2\mu\text{M}$ PE mit einer einmaligen Gabe von $1\mu\text{M}$ Acetylcholin (ACH) geprüft. Das Relaxationsverhalten wurde anhand einer Wirkungskurve bestimmt.

Da das Ausmaß der endothelabhängigen Relaxation (EDR) von der Intaktheit des Gefäßendothels abhängig ist, konnten dadurch quantitative Aussagen bezüglich der Funktionsveränderungen gemacht werden.

Die endothelabhängige Vasorelaxation reagierte auf die Konservierung in beiden Lösungen empfindlich. Bei jeweils $n=5$ konnte eine endothelabhängige Vasodilatation ausgelöst werden. Die prozentuale maximale Dilatation war bei $24,6 \pm 4,05\%$. Nach 48 h gab es keine Sensibilität der in Ringer-Lösung gelagerten Venen auf Acetylcholin, während 3 der 12 in Eigenblut gelagerten Venensegmente nach dieser Zeit noch eine endothelabhängige Relaxation (EDR) zeigten. Nach 96 h konnte an keinem Venensegment mehr eine EDR nachgewiesen werden.

Tab. 9: Vasorelaxation in Ringer-Lösung vs. Eigenblut

Zeit [h]	Ringer		Eigenblut		n
	[mN]	[%]	[mN]	[%]	
3	$-2,33 \pm 0,22$	$19,60 \pm 1,78$	$-2,70 \pm 0,39$	$24,60 \pm 4,06$	5
24	$-1,77 \pm 0,35$	$16,00 \pm 2,10$	$-2,19 \pm 0,14$	$20,40 \pm 1,50$	5
48	0	0	$-1,94 \pm 0,79$	$17,20 \pm 7,04$	5
72	0	0	$-1,64 \pm 0,17$	$6,20 \pm 3,07$	3
96	0	0	0	0	

Dargestellt ist das dilatative Verhältnis in beiden Lösungen in mN und Prozent mit entsprechenden Standardabweichungen nach induzierter Vorkontraktion mit $1\mu\text{M}$ Acetylcholin bei $n=5$.

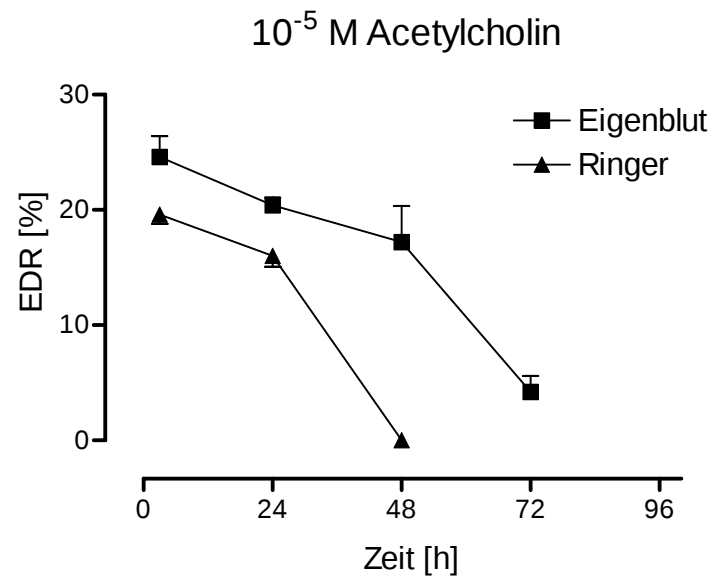


Abb. 12: Dargestellt ist die endothelabhängige Vasorelaxation [in %] der in Ringer-Lösung sowie in Eigenblut konservierten Venensegmente mit den dazu gehörenden Mittelwerten ($\pm$ SEM) nach Applikation von $1\mu\text{M}$ Acetylcholin nach Vorkontraktion mit $0,2\mu\text{M}$ Phenylephrin. Die Werte stehen in Bezug zu der jeweiligen Konservierungszeit [h], in der die Gefäßringe in Eigenblut sowie Ringer-Lösung gelagert wurden. In der Varianzanalyse zeigt sich eine Signifikans von $p < 0,0001$ für beide Konservierungsmedien.

4.2 Morphologische Analyse

Die auf Korkplatten aufgespannten und in Glutaraldehyd fixierten Venensegmente wurden im Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf, mittels eines Rasterelektronenmikroskops untersucht. Zuvor wurden die fixierten Venensegmente in den Glasbehältern durch uns für den Untersucher anonymisiert, indem wir die Glasbehälter mit Zahlen beschriftet haben. Hierdurch konnte eine geblindete Untersuchung an den Präparaten vorgenommen werden. Mittels Rasterelektronenmikroskopie konnte der Endothelstatus der verschiedenen Venensegmente untereinander verglichen und begutachtet werden. Insgesamt wurden 10 Venen untersucht. Jeweils 5 der zuvor in Eigenblut und Ringer-Lösung gelagerten Venen, die nach der Funktionsmessung in den entsprechenden Zeitintervallen fixiert wurden, wurden rasterelektronenmikroskopisch bei einer 625-fachen Vergrößerung ausgewertet und mit einer 206-fachen Vergrößerung photodokumentiert. Es zeigte sich, dass die Auswirkungen der Konservierungsmedien auf den morphologischen Erhaltungszustand des Endothels fast identisch waren, mit Ausnahme leichter Vorteile für das Medium Eigenblut im Zeitraum zwischen 48h – 72h.

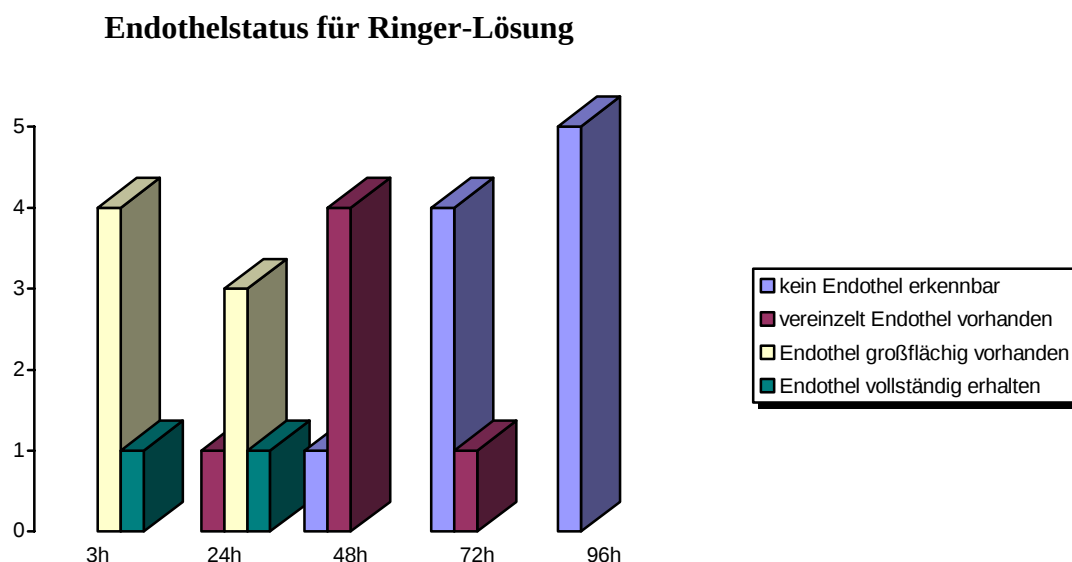


Abb. 13: Dargestellt ist der Score des jeweiligen Endothelzustandes der in Ringer-Lösung gelagerten Venensegmente über alle Meßzeitpunkte. Die Y-Achse gibt die n-Anzahl wieder, bei einem Gesamtwert von n=5.

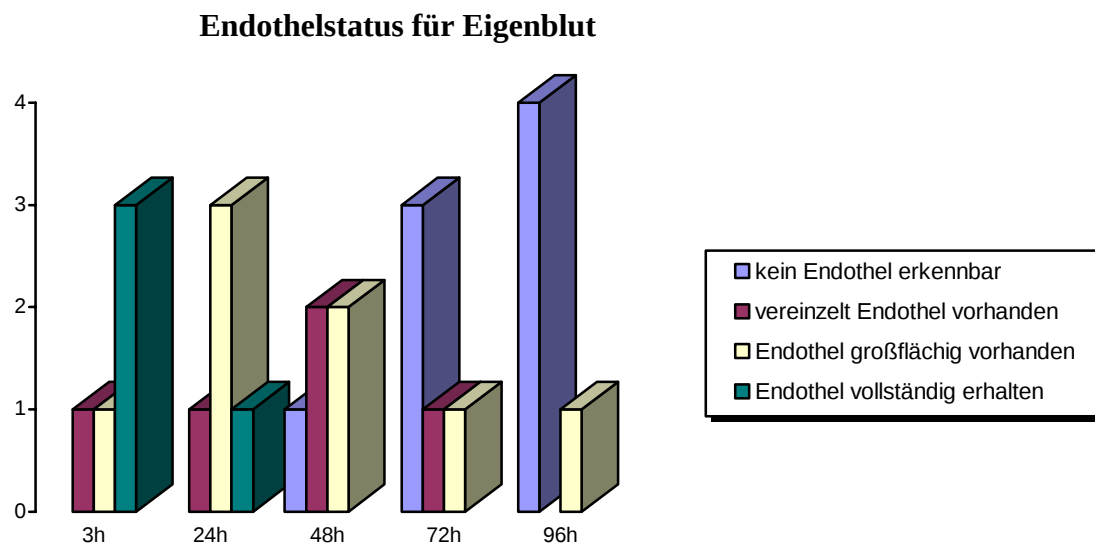


Abb. 14: Dargestellt ist der Score des jeweiligen Endothelzustandes der in Eigenblut gelagerten Venensegmente über alle Meßzeitpunkte. Die Y-Achse gibt die n-Anzahl wieder, bei einem Gesamtwert von $n=5$.

Die Beurteilung des Erhaltungszustandes des Endothels mittels Rasterelektronenmikroskops wurde mit Hilfe einer Score-Liste miteinander verglichen, die sich auf den morphologischen Status des jeweiligen Venensegmentes sowie auf die Konservierungslösung bezieht. Jeder Befund wurde nach einem Punktesystem (Ranking) klassifiziert. Zur Auswertung wurden nur die Segmente benutzt, die nach 3h einen großflächigen Endothelverband (Score: 3) aufwiesen oder das Endothel vollständig erhalten war (Score: 4).

Es ergab sich folgende Score-Liste:

Tab. 10: Endothel-Score in Ringer-Lösung vs. Eigenblut

SCORE $\pm$ SEM				
Zeit [h]	Ringer	n	Eigenblut	n
3	3,20 $\pm$ 0,20	5	3,40 $\pm$ 0,40	5
24	3,00 $\pm$ 0,32	5	3,00 $\pm$ 0,32	5
48	1,80 $\pm$ 0,20	5	2,20 $\pm$ 0,37	5
72	1,20 $\pm$ 0,20	5	1,60 $\pm$ 0,40	5
96	1,00 $\pm$ 0,00	5	1,40 $\pm$ 0,40	5

Dargestellt ist der Endothelstatus der in Ringer-Lösung sowie in Eigenblut gelagerten Venensegmente (n=5) mit dem dazugehörigen Punkte-Score ($\pm$ SEM) über die verschiedenen Messzeitpunkte.

Im Focus der Begutachtung stand der Umfang des verbliebenen Endothelrasens sowie eine mögliche Ablösung der Endothelzellreihen von der Basalmembran. Dabei fiel insbesondere auf, dass der Endothelzelldefekt bei den in Ringer gelagerten Venen früher auftrat. Speziell in den kurzen Lagerungsintervallen waren die Veränderungen bei in Eigenblut gelagerten Venen dezenter. Während sich dort erste Areale von Endotheldefekten zeigten, war bei vielen in Ringer-Lösung konservierten Venen ein größerer respektive totaler Endothelverlust diagnostizierbar.

In Betrachtung der morphologischen Auswertung wird ein Vorteil der Lagerung in Eigenblut sichtbar (Tab. 9). So schneiden die Eigenblut-Venen nach 72 h mit einem Punkte-Score von $1,60 \pm 0,4$ ab, die Ringer-Venen hingegen mit $1,20 \pm 0,2$. Auch nach 96h wiesen Eigenblut-Venensegmente im Vergleich zu Ringer-Venensegmenten ein plus-Score von 0,4 auf. Im direkten Vergleich sind sowohl bei Ringer-Venen als auch bei Eigenblut-Venen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der histopathologischen Morphologie des Gefäßendothels ersichtlich. Die morphologische Gesamttendenz weist auf einen möglichen Vorteil von Eigenblut als Konservierungsmedium hin (Abb. 15).

Tab. 11: Endothelstatus Ringer-Lösung vs. EigenblutPROZENT [%] $\pm$ SEM

Zeit [h]	Ringer	n	Eigenblut	n
3	80,00 $\pm$ 5,0	5	85,0 $\pm$ 10,0	5
24	75,00 $\pm$ 7,9	5	75,0 $\pm$ 7,9	5
48	45,00 $\pm$ 5,0	5	55,0 $\pm$ 9,4	5
72	30,00 $\pm$ 5,0	5	40,0 $\pm$ 10,0	5
96	25,00 $\pm$ 0,0	5	35,0 $\pm$ 10,0	5

Dargestellt ist der Endothelstatus der in Ringer-Lösung sowie in Eigenblut gelagerten Venensegmente ($n=5$) mit dem dazugehörigen Endothelstatus in Prozent ($\pm$ SEM) über die verschiedenen Messzeitpunkte.

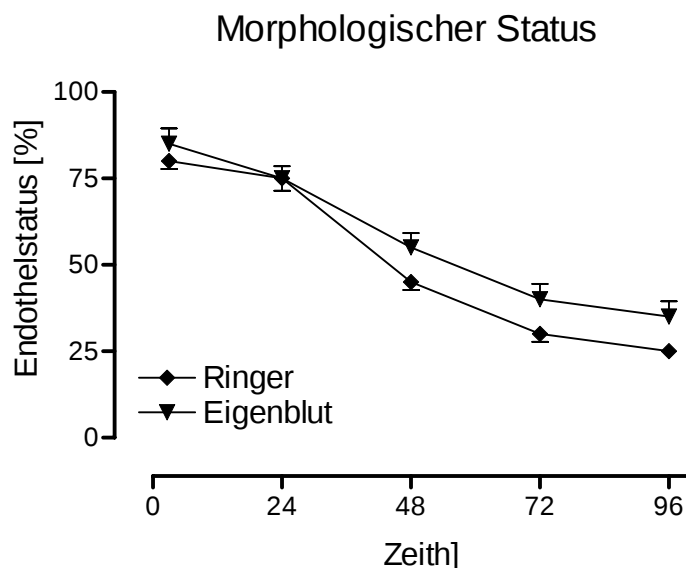


Abb. 15: Dargestellt ist der morphologische Endothelstatus der in Ringer-Lösung und in Eigenblut gelagerten Venensegmente ($n=5$) gegen die Zeit [h] in Prozent. Dabei entspricht 100% einem Punkte-Score von 4.

Es folgt eine exemplarische Auswahl der original REM-Aufnahmen der Endothelien der VSM- Segmente, anhand derer die histomorphologische Beurteilung erfolgte.

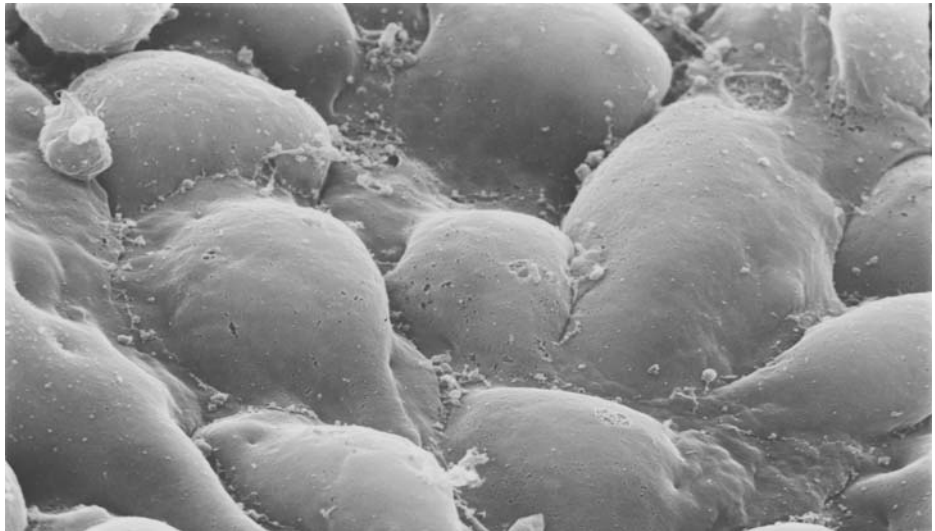


Abb.16:

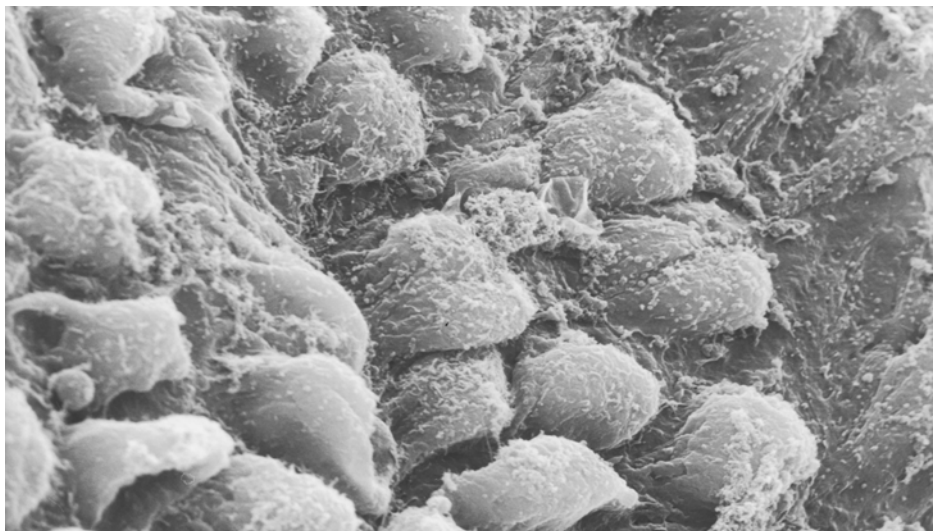


Abb.17:

Dargestellt ist oben der elektronenmikroskopische Endothelstatus des in Eigenblut (Abb.16) und in Ringer-Lösung (Abb.17) konservierten Venensegmente nach 3h mit positiver funktioneller Endothelreaktion. In beiden Venensegmenten läßt sich ein großflächig erhaltener Endothelrasen nachweisen (Score 4).



Abb. 18:

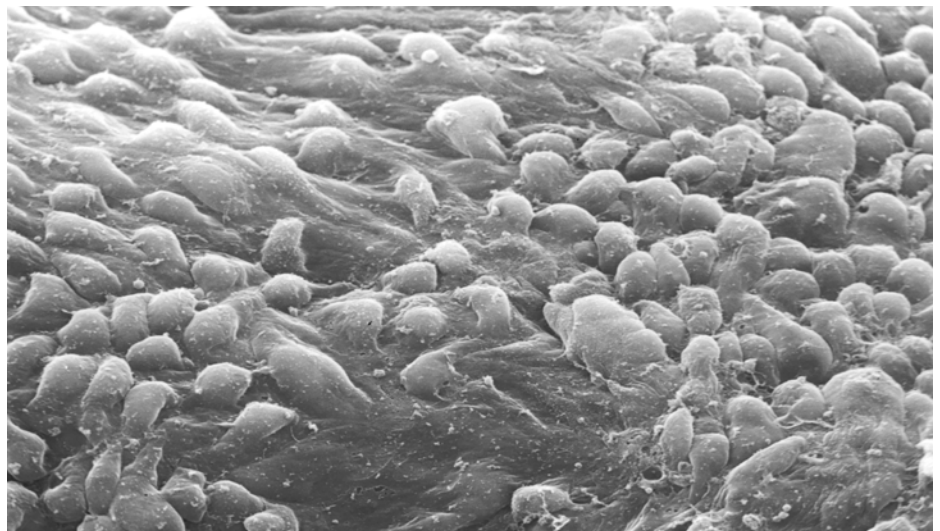


Abb. 19:

Dargestellt ist oben der elektronenmikroskopische Endothelstatus (mit 206-facher Vergrößerung) des in Eigenblut (Abb.18) und in Ringer-Lösung (Abb.19) konservierten Venensegmentes nach 24h. Das Endothel ist großflächig (75 %) erhalten (Score 3).

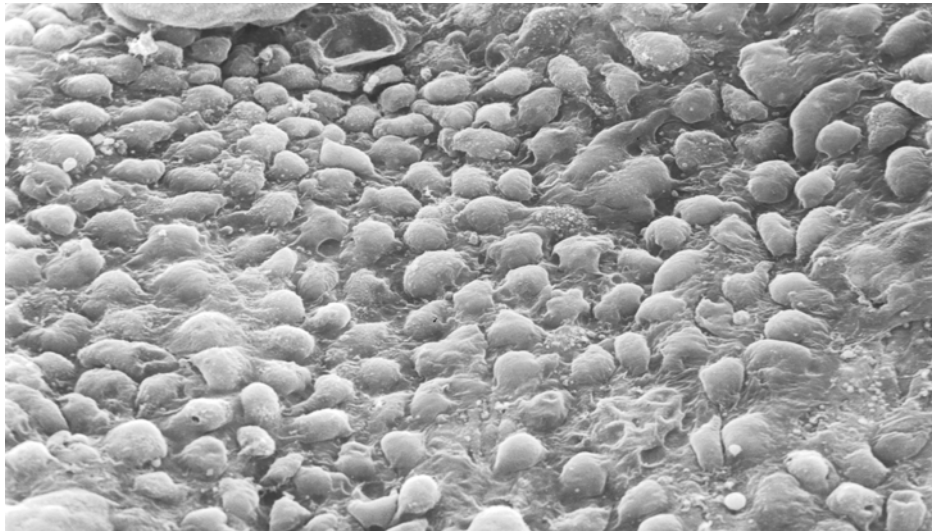


Abb.20:

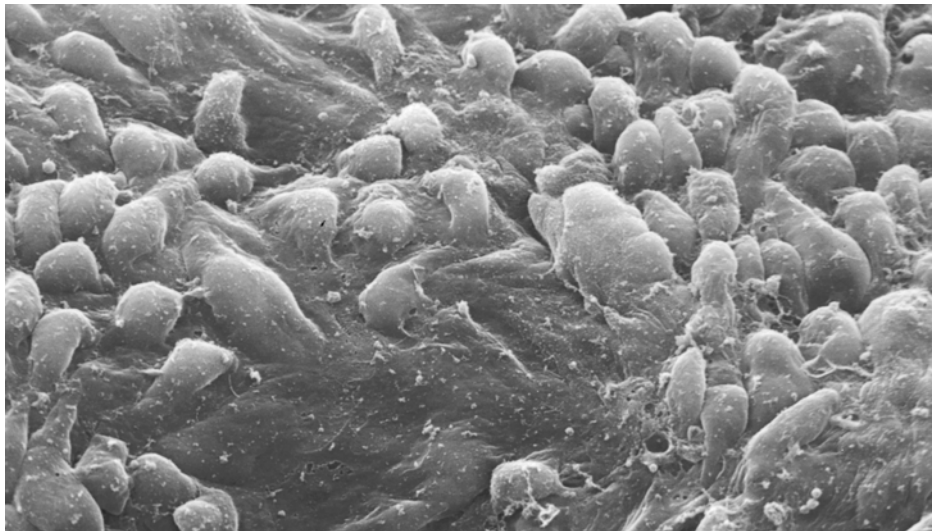


Abb.21:

Dargestellt ist oben in Abb. 20 der elektronenmikroskopische Endothelstatus des in Eigenblut konservierten Venensegmentes nach 48h. Unten in Abb.21 ist der Endothelstatus des in Ringer-Lösung gelagerten Venensegmentes nach 48h abgebildet. Ein Endothel ist großflächig vorhanden (Score 2-3).

Abb.22:

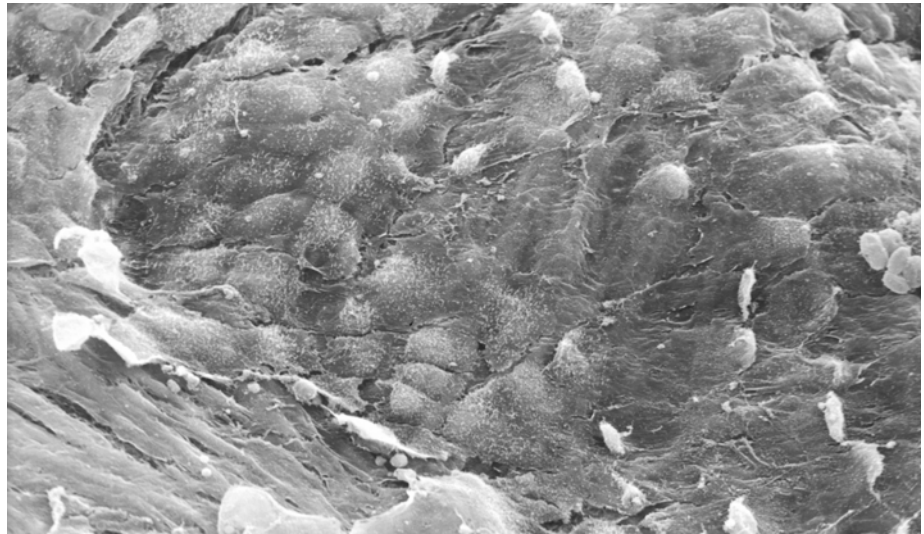
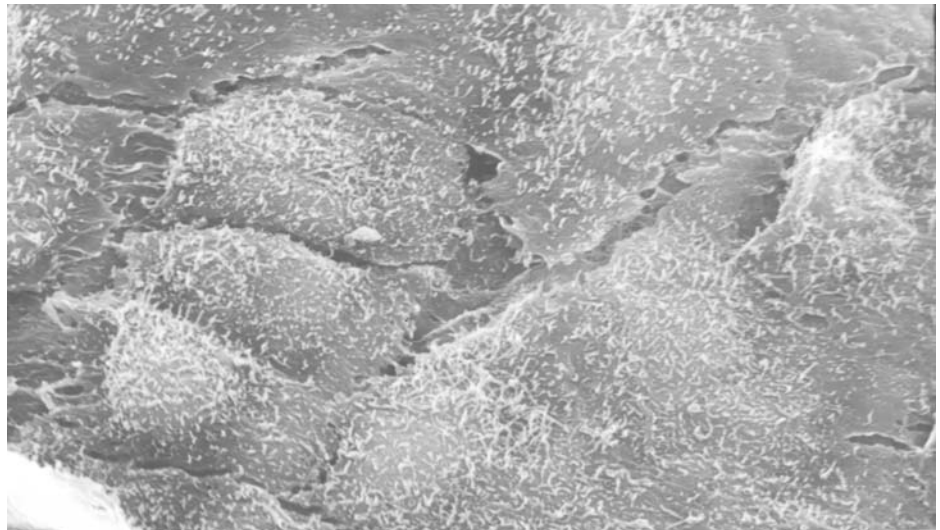


Abb.23:



Dargestellt ist der elektronenmikroskopische Endothelstatus des in Ringer- Lösung (Abb. 22) und Eigenblut (Abb.23) konservierten Venensegmente nach 72h. Auf der Abb.21 ist das Endothel nur vereinzelt erkennbar (Score 2).

Abb.24:

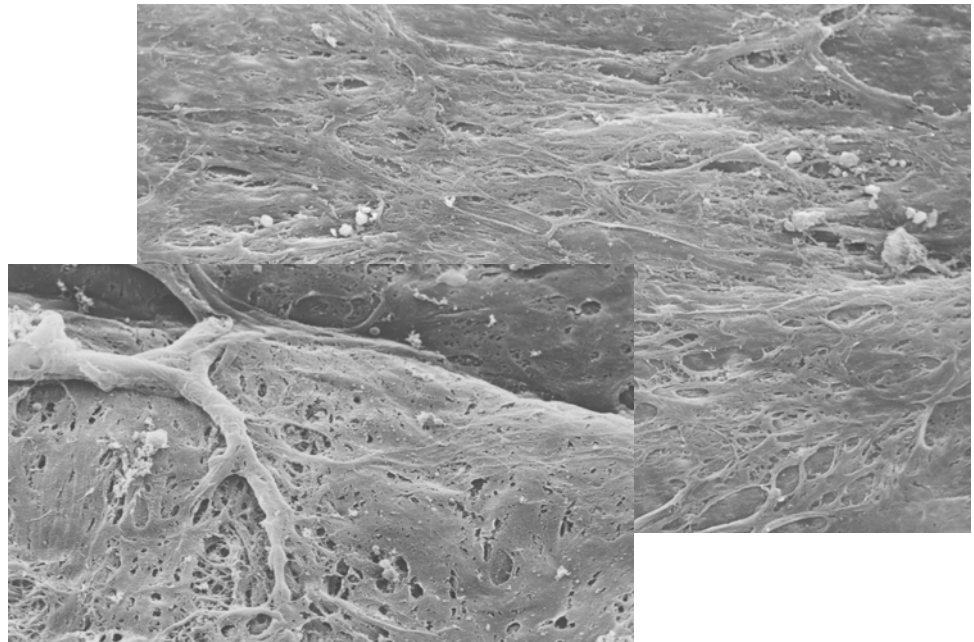
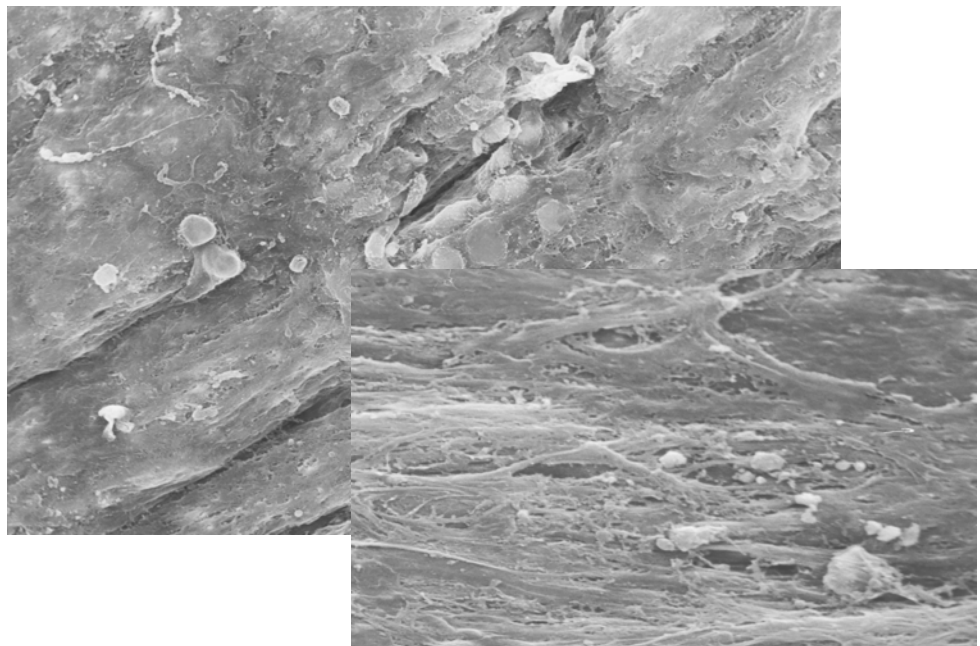


Abb.25:



Dargestellt ist der elektronenmikroskopische Endothelstatus des in Ringer-Lösung (Abb.24) und Eigenblut (Abb.25) konservierten Venensegmente nach 96h. In den Abbildungen ist die Intima der Gefäßwand jedoch ohne sichtbaren Endothelrasen. (Score 1). Die kleineren Abbildungen sind 625-fache Vergrößerungen.

4.3 Zusammenfassung

Die Lagerung explantierter und zur Transplantation vorgesehener humaner Venen ist von großer Bedeutung, nicht zuletzt deshalb, weil sie nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Daher sollte die Aufbewahrungslösung zum Erhalt des bestmöglichen Funktionszustandes des Transplantates beitragen. Wir konnten zeigen, dass die Wahl eines geeigneten Mediums, den Erhalt der Kontraktilität verlängert und die histomorphologische Endothelquantität und -qualität erhöht.

Die experimentelle Studie zeigt, daß

- die Lagerung der explantierten Venen in Ringer-Lösung bzw. Eigenblut für mehr als 72h hinsichtlich der rezeptorunabhängigen Gefäßmuskelkontraktion statistisch signifikante Unterschiede zeigt: Eigenblut ist als Konservierungsmedium der Ringer-Lösung deutlich überlegen.
- nach Lagerung der explantierten Venen in Ringer-Lösung und Eigenblut innerhalb von 72h eine kontraktile Antwort auf α -adrenerge Stimulation auslösbar ist. Bei höchster PE-Konzentration erreichen in Eigenblut konservierte Transplantate sogar höhere Gefäßspannungen als die in Ringer-Lösung gelagerten.
- Relaxation sich im rasterelektronischen Befund bei Konservierung in Ringer-Lösung bzw. Eigenblut ein zunehmender Endothelverlust zeigt. Eigenblut zeigt sich als vorteilhaft bezüglich des histomorphologischen Erhaltungszustandes.
- die Lagerung der explantierten Venen in Ringer-Lösung bzw. Eigenblut über große Zeitintervalle zwar zu einem Verlust der Funktion des Endothels führt, dieser jedoch keineswegs für beide Lösungen qualitativ und quantitativ gleich ist: Autologes Blut erweist sich als Konservierungsmedium vorteilhaft gegenüber der Ringer-Lösung. Eine Lagerung der Venentransplantate über 72 h hinaus ist nicht empfehlenswert. Autologes Eigenblut ist der Ringer-Lösung vorzuziehen.

5 Diskussion

5.1 Klinische Bedeutung von allogenen Venentransplantaten

Die autologe Vena saphena magna stellt bis heute in der Gefäßchirurgie das Bypassmaterial der Wahl dar. Dies gilt insbesondere bei der Rekonstruktion der Beinarterien (z.B. femoro-poplitealer Bypass oder kruraler Bypass).

Die Vena saphena magna Transplantate sind auch gegenwärtig in der Herzchirurgie zusammen mit den Arteriae mammae die Gefäße der ersten Wahl bei der Durchführung aortokoronarer Bypassoperationen. Gelegentlich finden andere Venen des Beines (Vena saphena parva), Armvenen und weitere autologe Arterien (A. radialis, A. gastroepiploica) Verwendung [Deutsch 1985].

Diese körpereigenen Venen sind jedoch im Einzelfall nicht immer in ausreichendem Maße verfügbar oder von zu geringer Qualität (z.B. bei ausgeprägter Varikosis). Besonders schlechte Offenheitsraten zeigen venöse Grafts bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und insulinpflichtigem Diabetes [van Brussel, 1995, Busse, 1996, Hausberg, 2000].

Vor allem die zunehmende Anzahl an Reoperationen mit dem bereits stattgehabten Verbrauch autologen Gefäßersatzmaterials ist oft ein limitierender Faktor. Die Gewinnung der oben genannten anderen autologen Arterien ist mitunter für den Patienten aufwendig und komplikationsträchtig (A. gastroepiploica). Synthetische Materialien, die zwar in der Gefäßchirurgie bereits breite Verwendung gefunden haben (silikonisierte Venen), können nicht immer mit Erfolg und zufriedenstellendem Ergebnis eingesetzt werden [Kadletz, 1989, Noishiki, 1995, Illuminati 1998, Jackson 2000]. Die Ursache scheint in der hohen Oberflächenthrombogenität sowie der Biodegeneration des synthetischen Materials zu liegen [Wengerter, 1999, Ommer, 2001], weshalb es zu Stenosen und Obliterationen kommt [Iaffaldano, 1995]. Ein zusätzliches Risiko stellt die Graft-Infektion dar [Kniemeyer, 1994, Hennes, 1996].

Die operative Wiederherstellung der Gefäßstrombahn nach fehlgeschlagener Dilatation, Stenteinlage, TEA oder Patcherweiterungsplastik [Mitchell, 1995] macht die V. saphena magna zu einem wertvollen Transplantationsgut. Bereits in den 80er Jahren wurden Versuche unternommen, auch durch Kryopräservierung von Spendervenien die Lücke bei der Materialgewinnung zu schließen. Die Ergebnisse dieser Versuche waren für den klinischen Gebrauch nicht befriedigend; so waren nach kurzer Zeit die meisten dieser Implantate bereits wieder verschlossen [Ono, 1998, Buckley 2000]. In tierexperimentellen Studien konnten Funktionsminderungen der glatten Muskulatur und EDR nachgewiesen werden [Elmore 1992]. Der Einsatz von Allotransplantaten in Kombination mit Immunsuppressivum ermöglicht heutzutage Offenheitsraten von 80-90 %, obwohl auch ohne Immunsuppressivum Einzelfälle beschrieben worden sind, die eine Offenheitsrate von 84 % nach bis zu einem Jahr bei arteriellen Rekonstruktionen erreichten [Suchy 1997]. Dies könnte auf besonders günstige Immunkonstellationen (Blutgruppe, HLA-System) zurückführbar sein.

5.2 Die klinische Bedeutung der immunologischen Abstoßungsreaktion

Bei der allogenen Transplantation stammt das Transplantat von einem genetisch unterschiedlichen Individuum der gleichen Spezies. Sie repräsentiert den Normalfall der klinischen Transplantation.

Im zeitlichen Verlauf einer Transplantation kann eine hyperakute (erste Tage nach Transplantation), eine akute (ab 4-5 Tage nach Transplantation) und eine chronische Abstoßung (langsame, progrediente Destruktion über Wochen) unterschieden werden. Die Abstoßung beruht auf Erkennung der fremden Antigene des Transplantates durch die Zellen des Empfängerimmunsystems. Diese auch als „host versus graft“ bezeichnete Abstoßung löst eine Kaskade einer komplexen Immunreaktion aus, welche ohne Behandlung zur Zerstörung des Transplantates durch sensibilisierte Lymphozyten und/oder Antikörper führt [Parkman, 1980].

Das Transplantatsüberleben in der Frühphase nach Organtransplantation konnte in den letzten Jahren vor allem durch Fortschreiten der immunsuppressiven Therapie deutlich verbessert werden [Wagner, 1995, Bergan, 1996]. Die Langzeitfunktion von Organ-transplantationen ist hingegen nach wie vor unbefriedigend. Ein später Funktionsverlust geht häufig einher mit starken morphologischen Veränderungen an den Transplantationsgefäßen – ein Prozeß, der als chronische Abstoßung (CR) bezeichnet wird. Aufgrund Ihrer Komplexität ist die Pathogenese der CR nur zum Teil verstanden [Schneeberger, 2000].

Obwohl lange Zeit behauptet wurde, dass Blutgefäße eine geringe Immunogenität besitzen, so waren sie doch häufig und schnell von Verschlussprozessen betroffen, da ihre immunogenen Eigenschaften nicht genügend erforscht waren. Man weiß heutzutage, dass es zu einer T-Zell vermittelten Abstoßungsreaktion kommt [Wagner, 1994, Carpenter, 1998].

Daher bedient man sich neben der traditionellen Immunsuppressiva wie Azathioprine, Steroide, Cyclosporin A sowie monoklonaler Antikörper gegen T-Zellen auch neuerer Medikamente wie Mycophenolate mofetil, Sirolimus und monoklonale Antikörper gegen Interleukin 2 – Rezeptoren [Wagner, 1995, Bergan, 1996, Ikonen, 2000]. Die Inzidenz der Abstoßung wird deutlich gesenkt [Bergan, 1999].

Diese Behandlungsformen sollten mit individuell angepassten Dosen erfolgen, da sie sich noch nicht selektiv auf die Abstoßungsvorgänge ausrichten lassen können. Zwar wird die Abstoßungsrate auf der einen Seite erheblich reduziert, auf der anderen Seite jedoch die Gefahr einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen gesteigert. Längerfristig wird ein deutlich verstärktes Auftreten maligner Erkrankungen registriert [Garnis, 1984].

Es gilt also, eine Balance zwischen dem Schutz des Organs und der Schwächung der Infektabwehr zu finden.

5.3 Die klinische Bedeutung des Endothels

Das Endothel wurde lange Zeit lediglich als mechanische Barriere zwischen strömendem Blut und der Gefäßwand sowie dem umgebenden Gewebe gesehen. Dabei besitzen Endothelzellen an Ihrer Oberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und Enzyme. Sie synthetisieren zahlreiche Mediatoren, welche regulativ den Gefäßtonus, die Thrombozytenfunktion sowie Blutgerinnungssystem beeinflussen [Herrmann, 2001].

In der Membran vaskulärer Endothelzellen existieren m-Cholinorezeptoren. Die Aktivierung derselben durch Acetylcholin oder zahlreichen anderen Substanzen führt zu einer Vasodilatation [Furchgott, 1980, Moncada, 1991]. Im Jahr 1980 beschrieben dann erstmals Furchgott und Zawadzki, daß eine Reihe von Substanzen nur in Anwesenheit eines intakten Endothels vasodilatierend wirken. Sie postulierten eine vom Endothel freigesetzte Substanz, die sie „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) nannten [Furchgott, 1980]. Bereits 7 Jahre später gelang es, die sehr kurzlebige Substanz zu identifizieren. Die Aufklärung der chemischen Identität und die Entschlüsselung seiner Biosynthese führte zu einer rasanten Entwicklung, die bald erkennen ließ, daß hinter dem EDRF-Prinzip ein bisher unbekanntes und in all seinen Funktionen noch nicht vollkommen geklärtes Regulationsprinzip steht, das weit über die Regulation des Gefäßtonus hinausreicht [Furchgott, 1983]. Es ist heute bekannt, daß der EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) oder einer verwandten NO-haltigen Substanz identisch ist [Palmer, 1987, Ignarro, 1987]. NO wird aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert und bewirkt letztendlich die eigentliche Vasodilatation [Thom, 1987, Thulesius, 1988, Dohi, 1990]. Das verantwortliche Enzym (NO-Synthase) wird konstitutiv im Endothel exprimiert, und ist Kalzium- und Calmodulinabhängig. EDRF (NO) stellt eine der potentesten relaxierenden Substanzen dar, die vom Endothel nach Stimulation einer großen Anzahl unterschiedlicher Aktivatoren freigesetzt und dann über die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase [Arnold, 1977, Kojda, 1993] der glatten Muskelzellen mit konsekutiver c-GMP-Erhöhung zur Vasodilatation führt [Ku, 1992]. Damit handelt es sich um das Wirkprinzip der Nitropräparate [Ignarro, 1981], weshalb EDRF (NO)

auch als endogener Nitrovasodilatator bezeichnet wird. Der Gefäßtonus wird über eine basal kontinuierliche EDRF (NO)-Freisetzung moduliert [Chua, 1993, Kojda, 1994].

Hinsichtlich der Tonusregulation von Gefäßen stellt das endotheliale NO-System einen Gegenspieler zum sympathischen Nervensystem und Renin-Angiotensin-System dar. Tatsächlich kommt es nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase durch L-Arginin-Analoga zu einem drastischen Anstieg des Gefäßwiderstandes [Dohi, 1990].

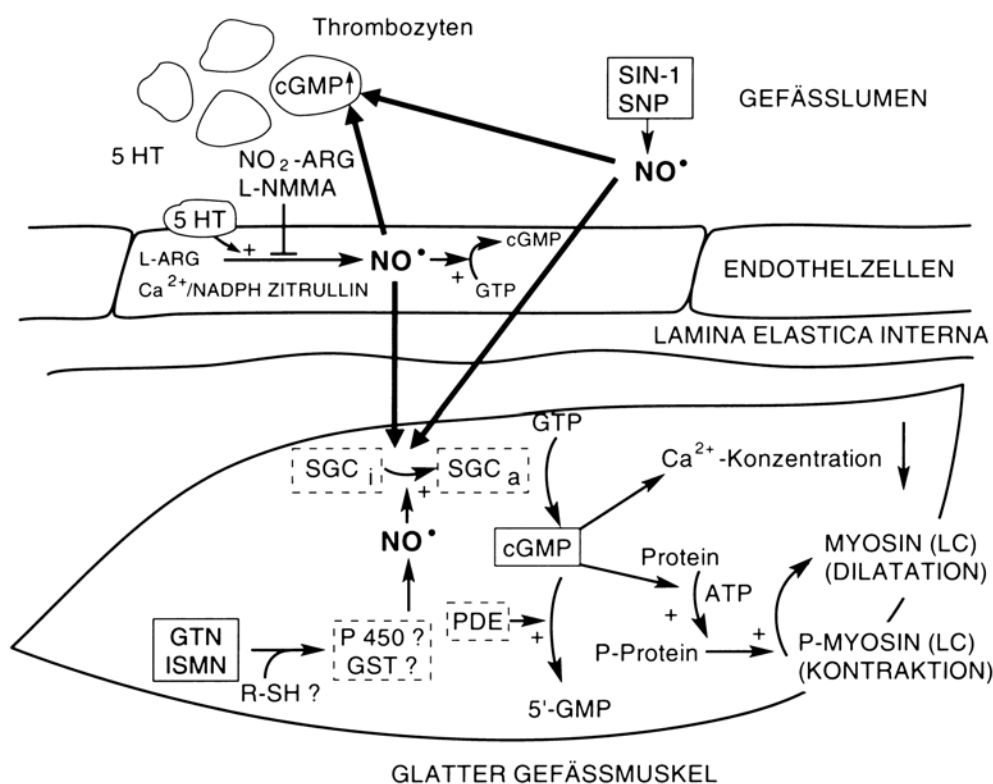


Abb.25: (aus G. Kojda et al. Pharmakologie/Toxikologie systematisch, 1997 UNI-MED Verlag)

Wirkungsmechanismus von exogenem (NO) und endogenem Stickstoffmonoxid (EDRF).

Neben dieser relaxierenden Wirkung ist EDRF ein potenter Hemmstoff der Plättchenaggregation und -adhäsion und entfaltet dabei zusammen mit Prostazyklin einen synergistischen Effekt. Zusätzlich hemmt EDRF die Adhäsion von Leukozyten an der Endotheloberfläche über eine Hemmung der Expression von Adhäsions-

molekülen [Liao, 1998]. Weiterhin scheint NO die Proliferation glatter Muskelzellen über einen c-GMP-abhängigen Mechanismus zu hemmen [Kojda, 1993].

5.4 Rezeptorunabhängig induzierte Vasokontraktion

Die Überprüfung der glattmuskulären Kontraktionseigenschaften mittels KCl ist ein in vielen Studien erprobtes Verfahren. Da es sich um eine rezeptorunabhängige Kontraktion handelt, kann so ein Überblick über den Funktionsstatus eines Gefäßes gewonnen werden. KCl führt zu einer Dauerdepolarisation der Membran der glatten Gefäßmuskulatur. Dadurch kommt es über die Öffnung von L-Typ Kanälen zu einer Erhöhung des Kalziumeinstroms in die Zelle und folglich zu einer Muskelkontraktion.

Bei der mit 80 mM KCl induzierten rezeptorunabhängigen Gefäßkontraktion, war die kontraktile Antwort in der Initialphase (3h) für beide Konservierungslösungen vergleichbar. Betrachtet man jedoch den Gesamtzeitraum über 96 h für beide Konservierungsmedien, so ergibt sich in der Varianzanalyse (ANOVA) Ringer zu Eigenblut ein signifikanter Abfall der Gefäßspannung für die in Ringer-Lösung konservierten Venen. Im Verlauf der Konservierungszeit kommt es, wie die Ergebnisse zeigen, zu einer Reduktion der maximalen Kontraktion nach KCl – Stimulation, wahrscheinlich als Ausdruck einer zunehmenden Schädigung des kontraktile Apparates. In den ersten 24 h der Konservierung wird der differente Erhaltungszustand besonders deutlich; während Ringer-Venen eine Verminderung der kontraktile Antwort zeigen, bleibt die Reaktion der Eigenblut-Venen konstant. Dies ändert sich auch nicht nach Konservierungszeiten von 72 bzw. 96 Stunden, wo ebenfalls ein statistisch signifikanter Abfall der Gefäßspannung der Ringer-Venensegmente zu verzeichnen ist. Dies lässt den Schluß zu, dass der Funktionsverlust der glattmuskulären Anteile sowie ihrer kontraktile Apparate in den Eigenblut-Venen langsamer fortschreitet als in den Ringer-Venen.

5.5 Rezeptorabhängige Vasokontraktion

Phenylephrin, welches in steigender Dosis verabreicht wurde um eine Vasokontraktion der glatten Gefäßmuskulatur zu induzieren, gehört zu den α -Adrenorezeptor-Agonisten.

Diese Substanzen entfalten ihre Wirkung über eine Stimulation von α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren glatter Gefäßmuskeln. Sie zeigen teilweise auch Wirkung an β -Adrenorezeptoren am Herzen [Jones 1993, Kojda 1997].

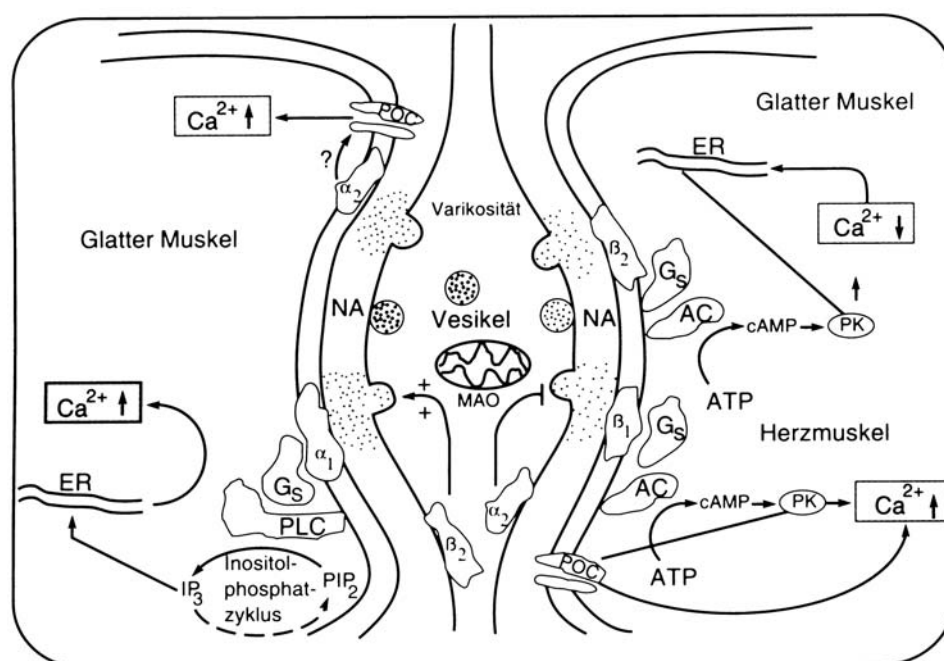


Abb.26: (aus G. Kojda et al. Pharmakologie/Toxikologie systematisch, 1997 UNI-MED Verlag)

Schematische Darstellung der Mechanismen, über welche natürliche Sympathomimetika die Impulse des synaptischen Nervensystems auf die Erfolgsorgane übertragen und die zur Auslösung der jeweiligen Effekte führen.

α , β : Adrenorezeptoren, G_s : stimulatorische Guanylnukleotid –bindende Proteine, AC: Adenylatzyklase, PK: Proteinkinase, POC: spannungsabhängiger Calciumkanal, ER: endoplasmatisches Retikulum, PLC: Phospholipase, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat, MAO: Monoamino-Oxidase, NA: Noradrenalin

Der glatte Gefäßmuskel, welcher als Hauptwirkort angesehen werden muß, antwortet darauf mit einer Folge von Reaktionen, die in der Abb.25 dargestellt sind.

Es kommt im wesentlichen zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Ca^{2+} und damit zu einer Konstriktion der glatten Gefäßmuskelzelle [Kojda 1997, Rasmussen 1986].

Die von uns untersuchten Venen reagierten entsprechend dem obengenannten Mechanismus auf die Zugabe von 0,2µM, 2µM sowie 20µM Phenylephrin. Die im Verlauf der Zeit abnehmende maximale Gefäßspannung unter PE - Stimulation ist - analog zu KCl - vermutlich ein Ausdruck der Schädigung des kontraktile Apparates der Gefäßwand.

Durch den direkten Vergleich der kontraktile Antwort der Venensegmente in den entsprechenden Zeiteinheiten – in ihren entsprechenden Lösungen - konnten wir Rückschlüsse auf den Erhaltungszustand der glattmuskulären Strukturen sowie deren Kontraktionsapparate ziehen. In unseren Ergebnissen konnten wir feststellen, dass die kontraktile Antwort, sowohl der in Eigenblut gelagerten Venen, als auch bei den in Ringer gelagerten Venen, vergleichbar bei 0,2µM und 2 µM PE war. In absoluten Zahlen zeichnete sich ein leichter Vorteil für Eigenblut-Venen ohne den statistischen Nachweis eines signifikanten Unterschieds. Wir konnten lediglich einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) für die Abnahme der Kontraktilität bei Vergleich beider Lösungen mit 20 µM PE über die Konservierungszeit hinweg beobachten, was vermutlich durch die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren zu erklären ist, die die Permeabilität der Kalziumkanäle für Kalziumionen erhöhen.

Über die Konservierungszeit hinweg blieb dieser leichte Vorteil der Eigenblut-Venen erhalten, so dass wir rückschlossen, dass der Funktionsverlust der gemessenen Venen-Segmente bei diesen etwas geringer ausfällt als bei Ringer-Venen.

Festzuhalten ist, dass bei beiden Lösungen die kontraktile Antwort merklich beeinträchtigt wurde.

Die Ergebnisse unserer Studie waren insofern vergleichbar mit den erzielten Ergebnissen anderer Studien wie die von Grohs, Kadletz et al., 1996. Es wurden neben Krebs-Henseleit, HTK (Brettschneider) und Albuminlösung auch das von uns verwendete autologe Blut untersucht [Grohs, 1996]. Diese Studie kam

auch zu dem Ergebnis, dass es nach 96 Stunden zwischen allen verwandten Lösungen zu keinen relevanten Unterschieden bezüglich des Kontraktionsverhaltens der Venensegmente mehr kam. In den Studien, in denen salinische Lösungen wie NaCl oder Ringer-Lactat untersucht wurden, kam es im Vergleich zu den nicht-salinischen Lösungen, deren Zusammensetzung sich am Plasma orientiert, zu einem schnelleren Funktionsverlust der glatten Muskulatur.

In einer weiteren Studie von Cartier und Bouchard, 1995, die auch den Effekt der Konservierungslösung auf die Lagerung von Venensegmenten untersuchten, wurde beschrieben, dass das autologe Blut gegenüber den salinischen Lösungen NaCl und Krebs Ringer vorteilhafter ist. In dieser Studie wird aber kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt.

5.6 Endothelabhängige Vasorelaxation (EDR)

Die große pathophysiologische Bedeutung einer gestörten Endothelfunktion ergibt sich aus den oben beschriebenen physiologischen Funktionen des endothelialen EDRF-Systems. Die Störung der Endothelfunktion ist dadurch charakterisiert, daß endothelabhängige vasodilatatorische Substanzen nicht mehr gebildet werden können, und daß die Wirkung dieser Substanzen an den glatten Gefäßmuskelzellen abgeschwächt ist [Liao, 1998]. Da das Ausmaß der EDR anhängig ist von der Intaktheit des Gefäßendothels, konnten wir so schlussfolgern, dass bei den Segmenten, die nicht auf Acetylcholin (ACH) reagiert haben, eine endotheliale Dysfunktion bzw Endothelablösung vorgelegen haben muß (s. morphologischer Status unten).

Vermutlich ist dieser Endothelschaden durch einen Mangel an biologisch aktivem NO bedingt. Experimentelle Daten weisen auf unterschiedliche Ursachen für dieses NO-Defizit. Eine dieser Ursachen könnte die vorbestehende Atherosklerose sein [Sessa, 2001], die durch eine verminderte Freisetzung von NO und folglich einer Störung der Signaltransduktion in den Membranen der Endothelzelle auftritt [Flavahan, 1992]. Tierexperimentelle Studien belegen, dass bei Atherosklerose ein

Argininmangel besteht [Hacker, 1999]. Ob letztendlich durch Arginin-Applikation die Endothelfunktion verbessert wird, konnte bisher an gesunden Gefäßen nicht bewiesen werden.

Die Ergebnisse früherer Untersuchungen stimmen mit den Resultaten der hier durchgeführten Studie überein. Unseren Ergebnissen nach reagierte die endothelabhängige Relaxation auf die Konservierung in beiden Lösungen sehr empfindlich. Bei vergleichbarem Relaxationsverhalten für beide Lösungen in der Initialphase, konnten erste Unterschiede nach 48 h gesehen werden. Während alle Venensegmente, die in Ringer-Lösung gelagert wurden, keine EDR zeigten, so waren es immerhin 3 der Eigenblut-Venen (n=5), die eine Relaxation bei 72 h aufwiesen. Nach 96h konnte keine Vasorelaxation mehr bei beiden Konservierungsmedien aufgezeigt werden.

5.7 Morphologischer Endothelstatus

Viele Studien zeigen, dass die Endothelfunktionen in Begleitung von internistischen Begleiterkrankungen abnehmen, so dass es z.B. zu Gefäßveränderungen bei Niereninsuffizienz bzw. Hypertonus kommt [Busse, 1996, Hausberg, 2000, Puddu, 2000]; oder etwa bei endokrinologischen Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes Typ I und Typ II eine endotheliale Dysfunktion auftritt [de Vriese, 2000, Dogra, 2001]. Ähnlich auch beim primären Hyperparathyreoidismus.

Degenerative Prozesse bewirken eine Endothelzelldysfunktion, die mit endzündlichen Zelladhäsionen, Kumulation von zellulären und Matricelementen einhergehen, die zu fibrozellulären Plaques führen [Schwartz, 1997]. Die entscheidende Rolle des dysfunktionalen Gefäßendothels für das Auftreten von Frühverschlüssen und Reststenosen ist durch aussagekräftige Studien belegt. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß zweier Lösungen während der Lagerungszeit von Venentransplantationen bezüglich der Endothelschäden mit direkten Nachweismethoden wie der Rasterelektronenmikroskopie qualifiziert und quantifiziert. Im Ergebnis scheint autologes Blut sich besser für die Lagerung von humanem Venenmaterial zu eignen als die salinische Lösung. Dies wird besonders

im klinisch relevanten Zeitraum von 48-72 Stunden deutlich. Die Endotheldefekte, die bis zum Ablösen und Aufrollen des Endothelrasens bei Ringer-Venen geführt haben, scheinen weniger im Blutplasma aufzutreten als in einer rein salinischen Lösung. Entsprechend unseren Ergebnissen konnte in einer Studie festgehalten werden, dass sich heparinisiertes Eigenblut gut für die Preservation von Endothelien sowie den Erhalt der kontraktile Funktion eignet [Chong, 2001]. In einer weiteren durchgeführten Studie an Umbilikalvenen konnte aufgezeigt werden, dass salzhaltige Lösungen schon nach 6 Stunden Konservierungszeit zu Strukturveränderungen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums, des Nukleus sowie des Cytoskeletts geführt haben [Eberl, 1999].

Anmerken muß man jedoch, dass nicht allein das Konservierungsmedium für den Erhalt der Endothelschicht des Transplantates verantwortlich ist, sondern auch die Lagerung bei kalten Temperaturen (4 °C) über 2 Wochen ein wichtiger Faktor für den Erhaltungszustand ist [Yang, 1999]. Dies konnte in vielen wissenschaftlichen Studien bewiesen werden.

Analog zu anderen geführten Studien zeigt unsere Studie auf, wie wichtig die Lagerungsbedingung sowie die Auswahl der Konservierungslösung bezüglich der Endothelintaktheit der Venensegmente ist. Die endotheliale Zellintegrität ist demnach von enormer Bedeutung für die Gefäßrekonstruktion und –transplantation [van Leeuwen, 2000]. Daher ist es wichtig, den Einfluß von Konservierungslösungen auf den Endothelzustand zu kennen [Welz, 1991] und in den klinischen Alltag einfließen zu lassen, um das Risiko eines thrombotischen Ereignisses mit konsekutivem Verlust des Transplantates zu reduzieren.

Da eine Reihe von Venensegmenten die unter Material und Methoden dargelegten Voraussetzungen nicht erfüllten, d.h. keine initiale Kontraktilität zeigten, verworfen werden mussten, vermuten wir, dass ein suboptimal präpariertes Venensegment auch eine Reihe von morphologischen und funktionellen Schäden aufweisen kann [Davies, 1994]. Ebenso wurden Venen ausgeschlossen, die bereits in der Initialphase kein Endothel aufwiesen. Dies führen wir auf perioperativ entstandene Mikrotraumen zurück.

Die Endothelzellen sind auch an der Auslösung von Immunreaktionen bei Allotransplantaten beteiligt. Sie können sehr effizient primäre und sekundäre Signale in T-Zellen auslösen [Wagner, 1994, Bergan 1999, Ikonen, 2000].

5.8 Verwendung anderer Konservierungslösungen

Neben der Kryokonservierung wurden viele Anstrengungen unternommen, alternative Lagerungsmedien zu erforschen, die bessere Resultate bezüglich des Erhaltungszustandes des Transplantationsgewebes liefern sollten.

In den letzten Jahren wurden diesbezüglich verschiedene Lösungen untersucht.

Dazu zählten u.a. die University of Wisconsin (UW - Belzer), EuroCollins, histidine-tryptophane-ketoglutarate (HTK), Celsior, St. Thomas, Krebs-Henseleit sowie salinische Lösungen.

Entsprechend unseren Ergebnissen lässt sich in vielen Studien belegen, dass sich salinische Lösungen nicht für die Konservierung von zellulären und subzellulären Strukturen eignen. Auch im Rahmen einer medizinischen Dissertation (Heinrich Heine Universität Düsseldorf) durchgeführten experimentellen Studie im Jahr 2002 mit der selben Methodik und der selben Zielsetzung, jedoch mit unterschiedlichen Lösungen (UW-Belzer versus HTK-Brettschneider) scheint UW-Belzer am geeignetsten zu sein [Bas, 2002]. Darin wird die Lagerung der Gefäßtransplantate für den Zeitraum bis zu 48 h in UW-Belzer empfohlen. Auch in anderen Studien heißt es, dass die Erhaltung glattemuskulärer Strukturen sowie der Endothelfunktion bei UW-Belzer besser sind, als in den vergleichbaren EuroCollins und Ringer- Lösung [Kanazawa, 1999], bei sehr gutem Erhalt der glattemuskulären Zellfunktionen und einer nichtsignifikanten Abschwächung der EDR auf Acetylcholin [Anastasiou, 1997]. Paral und Ferko kamen ebenfalls zu der Ansicht, dass die UW-Belzer Lösung das bessere Konservierungsmedium sei [Paral, 2000]. Im Vergleich des autologen Blutes mit salinischer Lösung NaCl wird berichtet, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede [Cartier, 1995] bei einer 60-minütigen Konservierungszeit gibt. Unsere Ergebnisse sowie die histomorphologische Untersuchung belegen,

dass bei einer Konservierungszeit über 48 Stunden hinaus, doch Unterschiede zu verzeichnen sind. In Studien, in der die Toxizität der Organkonservierungslösungen auf das Endothel untersucht wurde, schnitt die UW-Lösung bezüglich der Zellprotektion noch vor der EuroCollins oder der salinischen HTK bzw. Hank-Lösung ab, welches somit die Verlängerung der Lebensfähigkeit des Transplantates bedeuten könnte [Killinger, 1992].

Celsior, eine antioxidative, nicht-salinische, sogenannte cold-storage Lösung, die zu der Gruppe der neuen Konservierungslösungen gehört und in den USA die Zulassung als Konservierungslösung für Herztransplantate erhalten hat (1999), vermag auch in der Lungenpreservation bessere Ergebnisse zu liefern als UW oder EuroCollins [Roberts, 1999, Wittwer, 1999]. Auch in der Konservierung der Endothelstrukturen scheint die Celsior-Lösung im Vergleich zu den Kontrollgruppen vorteilhafter zu sein. Die G-Protein vermittelte, endothelabhängige Vasorelaxation - folglich auch die Endothelfunktion - scheint sich bei in Celsior gelagerten Koronararterien besser zu erhalten, als in der verglichenen salinischen Lösung [Perrault, 2001]. Es liegen jedoch leider keine Ergebnisse über die Vena saphena magna vor, so dass man Vergleiche ziehen könnte.

Während vielversprechende Ergebnisse über UW-Lösung bzw. Celsior veröffentlicht werden, muß dennoch angemerkt werden, dass auch diese Lagerungsmedien im Sinne einer Struktur- und Funktionserhaltung nur suboptimal geeignet sind.

Bei all den gegenwärtigen Bemühungen, die morphologischen Destruktionen der Endothelien und die der glattmuskulären Strukturen so niedrig wie möglich zu halten, stößt man doch auf Zellveränderungen und Funktionseinschränkungen seitens des zu konservierenden Transplantates [Cavallari, 1997, Mingoli, 1998], selbst nach kurzen Konservierungszeiten wie 3h.

Es treten signifikante morphologische Zerstörungen des Endotheliums auf, die als lagerungsbedingte Probleme angesehen werden können [Yang, 1999].

Wichtig scheint zudem, dass die Lösungen, die in ihrer Zusammensetzung dem Blutplasma ähneln, die Zellhyperplasie unterbinden [Davies, 1994] und die biochemischen Parameter nicht negativ beeinflussen. Der negative Einfluss der verschiedenen Lagerungsmedien auf den NAD- und ATP-Haushalt und die daraus

resultierenden DNA-Destruktionen konnte signifikant anhand von Vergleichsstudien zwischen UW – Belzer und EuroCollins Lösungen nachgewiesen werden [Warnick, 1992]. Diese negativen Faktoren sollten bei der Entwicklung neuerer Konservierungslösungen bedacht werden.

Weiterhin scheint es eine Rolle zu spielen, in welchem Behälter die Gefäße gelagert werden. So wird in einer holländischen Studie beschrieben, dass die Lagerung in Glasflaschen sich besser eignet, als entsprechende Plastikbehältnisse, die die Endothelschichtabdeckung weniger negativ beeinflussen [van Leeuwen, 2000].

Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren könnte die Erhaltung der glattmukulären Strukturen sowie der Endothelschicht und ihrer Funktion auf mehreren Ebenen verbessert werden.

Leider ist es bis heute nicht gelungen, das optimale Lagerungsmedium zu finden. Dies gilt sowohl für perioperative Lagerungen als auch für klinisch relevante Konservierungszeiten, so dass es hier gilt, verbesserte Lagerungstechniken zu entwickeln [Killinger, 1992].

5.9 Blick in die Zukunft

An mehreren Ansätzen wird heute intensiv geforscht, um den Mangel an Organen zu überwinden. Neben der Schaffung künstlicher Organe wird auch intensiv im Bereich der Xenotransplantation geforscht [Ljung, 1995]. In die Schlagzeilen rückten Ende 1998 die Stammzellen, aus denen in Zukunft vielleicht Organe gezüchtet werden könnten [Ferber, 2000]. Keine der denkbaren Alternativen zur Organspende, inklusive der Xenotransplantation, steht unmittelbar vor dem klinischen Durchbruch. Bereits praktiziert wird die Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut.

Die heute verfügbaren Immunsuppressiva wirken noch immer unselektiv auf die T-Zellen und haben zum Teil beträchtliche Nebenwirkungen. Es werden nicht nur die gegen das Transplantat gerichteten Abwehrzellen geschwächt, sondern auch diejenigen, die den Körper vor Infektionserregern schützen. So können sich endogene wie exogene Infektionen ungehemmt ausbreiten [Disney, 1992]. Die

Haupttodesursachen bei transplantierten Patienten sind daher Infektionen. Eine Hauptaufgabe der Forschung im Bereich der Transplantationsmedizin ist deshalb die Entwicklung besserer, selektiverer Immunsuppressiva [Vella, 1997; Paul, 1999]. 1997 wurde der erste gentechnisch hergestellte, monoklonale Antikörper gegen Abstossungsreaktionen bei Nierentransplantationen eingeführt [Vella, 1998].

6 Zusammenfassung

Postmortale Venenpräparate spielen gegenwärtig im Rahmen allogener Gefäßtransplantationen im klinischen Alltag eine zentrale Rolle. Erste Versuche auf diesem Gebiet zu Beginn des 20. Jh. scheiterten, neben technischen Problemen, an der damals unbekannten und unbehandelbaren Antigenität der Gewebe. Die neueren Forschungsergebnisse zur Transplantationsmedizin und Immunologie führten zu der Erkenntnis, dass auch allogene Venentransplantate eine behandlungsbedürftige Antigenität besitzen.

Die Einführung einer konsequenten und adäquaten Immunsuppression hat die Transplantationsresultate wesentlich verbessert, so dass nicht nur die Komplikationsrate gesenkt, sondern auch die Offenheitsrate auf aktuell 80% nach 2 Jahren verbessert werden konnte. Somit unterscheiden sich die Erfolge bei Verwendung allogener Venentransplantate und adäquater Immunsuppression kaum mehr von denen der autologen Transplantation. Die allogene Venentransplantation kann klinisch bei Fehlen eigener geeigneter Venen empfohlen werden. Ein wesentliches Problem der allogenen Venentransplantation bleibt jedoch die Frage nach der optimalen Konservierung und Preservation der Präparate bis zum OP-Termin, so dass ein möglicher Funktionsverlust weitgehend vermieden werden kann.

In einer von Langhammer 1987 (Universität Düsseldorf) durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass neben autologem Blut nur Konservierungslösungen mit niedrigem Gehalt an Natriumionen einen befriedigenden Erhaltungsstand des Venentransplantats gewährleisten. Die Methodik dieser Studie beschränkte sich allerdings auf die pH-Messung des Endothels als Ausdruck von vitalen Stoffwechselvorgängen und einer histomorphologischen Analyse.

Das Ziel unserer Studie war die Klärung des bestmöglichen Erhaltungszustandes und des daraus resultierenden optimalen Zeitintervalles zwischen Entnahme und Transplantation des allogenen Venentransplantates. Dabei sollte der unterschiedliche Einfluß der salinen Ringer-Lösung und des autologen Blutes auf die Vasokontraktion und die endothelabhängige Gefäßrelaxation (EDR) aufgezeigt werden. Hierzu sind die Konservierungsmedien (Ringer (Braun®), heparinisiertes autologes Eigenblut) sowie die Lagerungsbedingungen geprüft worden. Zur Präparation der isolierten humanen VSM wurden Restvenen, die im Rahmen kardiovaskulärer Operationen

verblieben, verwandt. Eine Differenzierung der Venen nach Erkrankung des Spenders wurde nicht vorgenommen. Es konnte lediglich bei verwendeten Venen die Begleiterkrankung Diabetes mellitus ausgeschlossen werden. Nach erfolgreicher koronarer Bypass-Operation wurde die übriggebliebene Restvene (i.d.R. 2-7cm lange Segmente) in einen Plastikbehälter verbracht, der 35 ml Konservierungslösung (Ringer-Lösung bzw. autologes Blut) enthielt und bei ca. 4-8° Celsius unter Lichtprotektion gelagert wurde. Die Erfassung der vaskulären Funktion erfolgte sofort nach Übergabe 3h (Nullwert $\approx$ 3h nach der operativen Entnahme) bzw. nach 24h, 48h, 72h und 96 h Konservierungszeit. Zur Durchführung der Funktionstests wurden jeweils 3-4 mm lange Abschnitte von dem Hauptstück abgetrennt und in Organbädern mittels carbogen-begaster Krebs-Henseleit-Lösung (37°C, pH 7,4) 60 min unter 1g Vorspannung äquilibriert. Während der gesamten Präparationszeit wurde zum Schutz des endothelialen Zellgewebes mechanischer Streß durch Dehnen, Knicken oder Zusammendrücken vermieden. Die Gefäßspannung wurde isometrisch durch Dehnungsmeßstreifen bestimmt. Die Prüfung der vasokonstriktorisches Funktion erfolgte durch rezeptorunabhängige Stimulation mit 80 mM KCl und durch rezeptorabhängige Stimulation mit Phenylephrin (PE, 0.2 – 20 μ M). Die endothelabhängige Relaxation wurde nach einer Vorkontraktion mit 0.2 μ M PE mit 1 μ M Acetylcholin (ACH) geprüft. Das experimentelle Protokoll war für alle untersuchten Venensegmente identisch. Die Ergebnisse unserer experimentellen Studie zeigen hinsichtlich der rezeptorunabhängigen und α -adrenergen Stimulation deutlich, dass die Lagerung explantierter und zur Transplantation vorgesehener humaner Venen zu einem deutlichen Funktionsverlust nach 48 h führt. Eindrucksvoll erscheint auch der Verlust der Endothelfunktion. Dies äußerte sich vor allem bei Lagerung der explantierten Venen über einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden. Nach diesem Intervall verminderten sich insbesondere die kontraktile Antwort auf α -adrenerge Stimulation und die rezeptorunabhängige Gefäßmuskelkontraktion. Auch in den REM-Aufnahmen des Endothels dokumentierte sich der progrediente Endothelverlust über die Zeit. Desweiteren zeigte sich, dass die Funktionsminderung durch Lagerung von der Aufbewahrungslösung nur in geringem Maße abhängig ist. Autologes Blut erwies sich im Gesamten aber gegenüber der Ringer Lösung als vorteilhaft.

7 Literaturverzeichnis

- (1) **Anastasiou N**, Allen S, Paniagua R, Chester A, Yacoub M (1997) Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein. *J Vasc Surg* 25: 713-721
- (2) **Anders A**, Häring R, Poutot M, Sörensen R (1978) Klinische Ergebnisse der allogenen Venentransplantation. *Vasa* 7: 267 – 276
- (3) **Arnold WP**, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3203 – 3207
- (4) **Bas M**, (2002) Erhaltung endothelialer und glattmuskulärer Funktionen von humanen Vena saphena magna Transplantaten – Eine experimentelle Studie- MedDiss. Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- (5) **Bergan S**, Albrechtsen D, Fauchald P (1996) Mycophenolate mofetil - a new immunosuppressive agent. *Tidsskr Nor Laegeforen* 116: 2439 - 2441
- (6) **Bergan S**, Albrechtsen D, Bentdal O (1999) Immunosuppressive agents in organ transplantation. *Tidsskr Nor Laegeforen* 119: 3615-3620
- (7) **Boeken U** (1993) Cryopreservierte, homologe Venen als Gefäßersatz zur Beinerhaltung. Med.Diss. Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- (8) **Buckley CJ**, Abernathy S, Lee SD, Arko FR, Patterson DE, Manning LG (2000) Suggested treatment protocol for improving patency of femoral-infrapopliteal cryopreserved saphenous vein allografts. *J Vasc Surg* 32: 731 – 738
- (9) **Busse R**, Fleming I (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33: 181 - 194
- (10) **Cartier R**, Bouchard D, Latulippe JF; Buluran J (1995) Effect of solution of preservation on the vascular reactivity of human saphenous veins. *Ann Chir* 49: 728 - 734
- (11) **Carpenter JP**, Tomaszewski JE (1998) Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response *J Vasc Surg* 27: 492-499
- (12) **Carrel A** (1908) Results of the transplantation of blood vessels, organs and limbs. *J Am Med Ass* 51: 1662-1667.
- (13) **Cavallari N**, Abebe W, Mingoli A, Hunter WJ, Agrawal DK, Sapienza P, Cavallaro A, Edwards JD (1997) Short-term preservation of autogenous vein grafts: effectiveness of University of Wisconsin solution. *Surgery* 121: 64 - 71
- (14) **Chong WC**, Ong PJ, Hayward C, Moat N, Collins P (2001) Effects of storage solutions on in vitro vasoreactivity of radial artery conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122: 470 – 475
- (15) **Chua YL**, Pearson PJ, Evora PR, Schaff HV (1993) Detection of intraluminal release of endothelium-derived relaxing factor from human saphenous veins. *Circulation* 1993 88: 28 - 32

- (16) **Davies MG**, Hagen PO (1994) Influence of perioperative storage solutions on long-term vein graft function and morphology. *Ann Vasc Surg* 8: 150 – 157
- (17) **Deutsch M** (1985) The potentials of the saphenous vein in reconstructive surgery of the arteries - state of the art. *Thorac Cardiovasc Surg* 33: 385 - 388
- (18) **Deutsch M**, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P (1999) Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 126: 847 - 855
- (19) **De Vriese AS**, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963 - 974
- (20) **Disney AP** (1992) Complications of immunosuppressive therapy in transplantation. 1: Neoplasia and infection. *Med J Aust* 157: 262 - 264
- (21) **Dogra G**, Rich L, Stanton K, Watts GF (2001) Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia* 44: 593 – 601
- (22) **Dohi Y**, Thiel MA, Bühler FR, Lüscher TF (1990) Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. *Hypertension* 15: 170 - 179
- (23) **Eberl T**, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiss V, Kumpitsch B, Gnaiger E, Margreiter R (1999) Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 82: 253 – 260
- (24) **Elmore JR**, Gloviczki P, Brockbank KG, Miller VM (1992) Functional changes in canine saphenous veins after cryopreservation. *Int Angiol* 11: 26 – 35
- (25) **Ferber S** (2000) Can we create new organs from our own tissues? *Isr Med Assoc J* 2: 32 - 36
- (26) **Flavahan NA** (1992) Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanism underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity – *Circulation* 85: 1927 - 1938
- (27) **Furchgott RF**, Zawadzki J.V (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373 – 376
- (28) **Furchgott RF** (1983) Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ Res* 53: 557 – 573
- (29) **Garnis S**, Billick RC, Srolovitz H (1984) Eruptive vascular tumors associated with chronic graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* 10: 918 - 921
- (30) **Grohs JG**, Kadletz M, Wodraztka M, Wolner E, Raberger G (1996) Contractile function of human veins after long-term storage in different media. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 89 - 93
- (31) **Hacker A** (1999) Endothelprotektive Eigenschaften von NO-Donatoren bei experimentell ausgelöster Atherosklerose. *Math.Nat. Diss. Heinrich Heine Universität Düsseldorf*
- (32) **Hausberg M**, Kisters K, Kosch M, Barenbrock M (2000) Gefäßwandveränderungen bei Niereninsuffizienz. *Medizinische Klinik* 95: 279 – 285
- (33) **Hennes N**, Sandmann W, Torsello G, Kniemeyer HW, Grabitz K (1996) Infection of a vascular prosthesis- a retrospective analysis of cases. *Chirurg* 67: 37 - 43

- (34) **Herrmann J**, Lerman A (2001) The endothelium: dysfunction and beyond. *J Nucl Cardio* 8:197 – 206
- (35) **Hidalgo MA**, Sarathchandra P, Fryer PR, Fuller BJ, Green CJ (1995) Effects of hypothermic storage on the vascular endothelium: a scanning electron microscope study of morphological change in human vein. *J Cardiovasc Surg* 36: 525 - 532
- (36) **Iaffaldano RA**, Lewis BE, Johnson SA, Piffare R, McKiernan TL (1995) Patency of cryopreserved saphenous vein grafts as conduits for coronary artery bypass surgery. *Chest* 108: 725 - 729
- (37) **Ignarro LJ**, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Guetter CA (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside und nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218 : 739 – 749
- (38) **Ignarro LJ**, Buga G.M, Wood KS, Byrns R.E, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 9265 – 9269
- (39) **Ikonen TS**, Gummert JF, Serkova N, Hayase M, Honda Y, Kobayase Y, Hausen B, Yock PG, Christians U, Morris RE (2000) Efficacies of sirolimus (rapamycin) and cyclosporine in allograft vascular disease in non-human primates: trough levels of sirolimus correlate with inhibition of progression of arterial intimal thickening. *Transpl Int* 13: 314 - 320
- (40) **Illuminati G**, Calio' F. G., Bertagni A, Martinelli V (1998) Results of bypasses to the anterior tibial artery through the interosseous membrane. *Langenbeck's Arch Surg* 383: 259 – 264
- (41) **Jackson MR**, Belott TP, Dickason T, Kaiser WJ, Modrall JG, Valentine RJ, Clagett GP (2000) The consequences of a failed femoropopliteal bypass grafting: comparison of saphenous vein and PTFE grafts. *J Vasc Surg* 32: 498 - 504; 504 – 505
- (42) **Jones CJ**, De Fily DV, Patterson JL, Chilian WM (1993) Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha 2-adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation* 87: 1264 – 1274
- (43) **Kadletz M**, Rokitansky A, Wolner E (1989) Vascular replacement - a critical evaluation of status. *Zentralbl Chir* 114: 1249 – 1258
- (44) **Kanazawa S**, Tsunoda T, Murakami M (1999) Forskolin-stimulated adenylylcyclase activity: a marker to assess islet cell viability following cold storage in different solutions and to predict islet cell function following transplantation. *Cell Transplant* 8: 383 - 388
- (45) **Killinger WA**, Dorofi DB, Keagy BA (1992) Endothelial cell preservation using organ storage solutions. *Transplantation* 53: 979 - 982
- (46) **Kniemeyer HW**, Torsello G, Hennes N, Grabitz K, Sandmann W (1994) Fresh homologous arterial transplant as aorto-iliac –femoral vascular replacement in prosthesis infection. *Vasa* 23: 268 – 273
- (47) **Kniemeyer HW**, Reber PU, Hakki H (1998) Ulcus cruris--vascular etiology and surgical treatment options. *Ther Umsch* 55:643 -649

-
- (48) **Kojda G**, Noack E (1993) Nitrit oxide liberating soluble guanylate cyclase stimulating and vasorelaxing properties new nitrate compound SPM 3672. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 103 - 111
- (49) **Kojda G**, Beck JK, Meyer W, Noack Eicke (1994) Nitrovasodilator induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna: dependence on intact endothelium. *Br J Pharmacol* 112: 533 – 540
- (50) **Kojda G** (1997) *Pharmakologie/Toxikologie systemisch* – UNI-MED Verlag
- (51) **Ku DD**, Zaleski JK, Liu S, (1993) Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 265: 586 - 592
- (52) **Lamm P**, Juchem G, Milz S, Schuffenhauer M, Reichart B (2001) Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations. *Circulation* 12 : 108 - 114
- (53) **Liao JK** (1998) Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* 44: 1799 – 1808.
- (54) **Ljung T**, Pittman K, Thomas FT (1995) Successful long-term pancreatic islet cell xenotransplantation and functional tolerance in NOD mice. *Transplant Proc* 27: 1351 –1352
- (55) **Luther B**, Pillny M, Müller B, Lance M, Sandmann W (2001) Is the revascularisation of pedal arteries worthwhile in diabetic gangrene. *Vasa Suppl* 58: 34 – 39
- (56) **Luther B**, Bas M, Saklak M, Kojda G, Reinecke P, Sandmann W (2002) UW-Belzer – Konservierung menschlicher Venenexplantate – eine sichere Methode bis zu 48h. *Tx Med* 14: 266 – 272
- (57) **Luther B**, Balzer KM, Reinecke P, Wassmuth R, Sandmann W (2004) Die homologe Venentransplantation zu kruropedalen arteriellen Rekonstruktion. *Chirurg* 75: 153 - 159
- (58) **Meyerson SL**, Schwartz LB (1999) Gene therapy as a therapeutic intervention for vascular disease. *J Cardiovasc Nurs* 13: 91 - 109
- (59) **Mingoli A**, Sapienza P, Edwards JD, Cavallari N (1998) Regarding "Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein". *J Vasc Surg* 27: 385 - 386
- (60) **Mingoli A**, Sapienza P, Feldhaus RJ, Di Marzo L, Burchi C, Cavallaro A (2001) Femorofemoral bypass grafts: Factors influencing long-term patency rate and outcome. *Surgery* 129:451 - 458
- (61) **Mitchell RN**, Jonas RA, Schoen FJ (1995) Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg* 60: 108 – 112
- (62) **Moncada S**, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide:Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109 – 142
- (63) **Noishiki Y**, Yamane Y, Tomizawa Y, Matsumoto A (1995) Transplantation of autologous tissue fragments into an e-PTFE graft with long fibrils. *Artif Organs* 19:17 - 26
- (64) **Ochsner JL**, Lawson JD, Eskind SJ (1984) Homologous veins as an arterial substitute: long-term results. *J Vasc Surg* 1: 306 - 313
- (65) **Ommer A**, Pfeiffer T, Pillny M , Sandmann W (2001) Misserfolge nach Stentangioplastie der A. carotis. *Gefäßchir.* 6: 15 - 21

- (66) **Ono M**; Nakajima J, Lee MC, Hirata K, Kobayashi J, Kawauchi M, Kotsuka Y, Takamoto S, Furuse A (1998) Influence of cryopreservation on human vascular endothelial cell immunogenicity. *Transplant Proc* 30: 3915 - 3916
- (67) **Palmer RM**, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 524 – 526
- (68) **Paral J**, Ferko A, Mericka P, Slizova D; Nozicka J, Chovanec V, Raupach J (2000) Preservation of venous grafts. *Rozhl Chir* 79: 244 – 249
- (69) **Parkman R**, Rapoport J, Rosen F (1980) Human graft versus host disease. *J Invest Dermatol* 74: 276 - 279
- (70) **Paul LC** (1999) The future of new immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 31: 16 - 18
- (71) **Perrault LP**, Nickner C, Desjardins N, Dumont E, Thai P, Carrier M (2001) Improved preservation of coronary endothelial function with Celsior compared with blood and crystalloid solutions in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 20: 549 - 558
- (72) **Puddu P**, Puddu GM, Zaca F, Muscari A (2000) Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol* 55: 221 – 232
- (73) **Rasmussen M** (1986) The calcium messenger system. First part. *N Engl J Med* 314: 1094 – 1101
- (74) **Roberts RF**, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML (1999) A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation* 67: 152 – 155
- (75) **Sandmann W**, Kniemeyer HW, Jalschak R, Grabitz K (1990) Operative Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten bei Diabetes Mellitus; in-situ-Saphena-Bypass versus Umkehrbypassverfahren – eine retrospektive Studie. *Vasa* 19: 47-53
- (76) **Schneeberger S**, Mark W, Seiler R, Offner F (2000) Chronische Abstoßung im Herztransplantationsmodell der Ratte: Effekt von syngener Retransplantation und immunsuppressiver Therapie mit Cyclosporin A und Sinomenin. *Deutsche Gesell Chir* 29: 182
- (77) **Schwartz LB**, Moawad J (1997) Gene Therapy for Vascular Disease. *Ann Vasc Surg* 11: 189 – 199
- (78) **Sessa C**, Morasch MD, Friedland M, Kline RA (2001) Risk factors of atherosclerosis and saphenous vein endothelial function [In Process Citation]. *Int Angiol* 20: 152 - 163
- (79) **Staudacher M** (1974) Homologous transplantation of the freeze dried vein--experimental contribution to the problem: vessel substitution. *Vasa* 2: 1 - 22
- (80) **Staudacher M** (1973) Spätschicksal der transplantierten Vene. *Thoraxchirurgie* 21: 371 - 377
- (81) **Suchy T**, Stadler P (1997) Allogenic vein transplantation in vascular surgery *Rozhl Chir* 76: 594 - 597
- (82) **Svensson EC**, Schwartz LB (1998) Gene therapy for vascular disease. *Curr Opin Cardiol* 13: 369-374

- (83) **Thom SM**, Hughes AD, Martin G, Sever PS (1987) The role of endothelium in the control of venous tone: studies on isolated human veins. *Clin Physiol* 73: 547 – 552
- (84) **Thulesius O**, Ugaily-Thulesius L, Neglen P, Shuhaiber H (1988) The role of endothelium in the control of venous tone: studies on isolated human veins. *Clin Physiol* 8: 359 – 366
- (85) **van Brussel BL**, Plokker HW, Voors AA, Ernst JM, Ernst NM, Knaepen PJ, Koomen EM, Tijssen JG, Vermeulen FE (1995) Multivariate risk factor analysis of clinical outcome 15 years after venous coronary artery bypass graft surgery. *Eur Heart J* 16: 1200 - 1206.
- (86) **van Leeuwen EB**, Molema G, van Luyn MJ, de Jong KP, Dijk F, Sloof MJ, Ruiters MH, van der Meer J (2000) Scanning electron microscopic analysis of endothelial cell coverage and quality in large vessels from multi-organ donors effects of preservation on endothelial cell integrity. *Clin Transplant* 14: 246 - 251
- (87) **Vella JP**, Sayegh MH (1997) Current and future immunosuppressive therapies: impact on chronic allograft dysfunction. *J Nephrol* 10: 229 – 231
- (88) **Vella JP**, Sayegh MH, Turka LA (1998) Developments in the clinical science of transplantation during the 20th century. *Pediatr Transplant* 2: 257 - 262.
- (89) **Wagner E**, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R (1995) Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 1732 - 1744
- (90) **Wagner E**, Roy R, Marois Y (1994) Posttransplant antibodies and fresh venous allograft failure in dogs. *Transplantation* 58: 537 - 542
- (91) **Warnick CT**, Stevens MH, Richards KF, Rees WV, Belnap LP, Stevens LE (1992) Biochemical parameters which may be useful in improving organ viability after storage. *J Surg Res* 52: 239 - 242
- (92) **Welz A**, Stadtmüller A; Schaffer U; Stroschneider T; Hannekum A (1991) Cytotoxicity of various crystalloid solutions to the endothelial cells of autologic grafts. *Thorac Cardiovasc Surg*. 39: 236 - 240
- (93) **Wengert K**, Dardik H (1999) Biological vascular grafts. *Sem Vasc Surg* 12: 46 - 51
- (94) **Wittwer T**, Wahlers T, Fehrenbach A, Cornelius JF, Elki S, Ochs M, Fehrenbach H, Albes J, Haverich A, Richter J (1999) Combined use of prostacyclin and higher perfusate temperatures further enhances the superior lung preservation by Celsior solution in the isolated rat lung. *J Heart Lung Transplant* 18: 684 – 692
- (95) **Yang XP**, Chiba S (1999) Effects of prolonged cold storage on purinergic and adrenergic components of sympathetic co-transmission in isolated canine splenic arteries. *Jpn J Pharmacol* 81: 163 – 169

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. W. Sandmann, dem Direktor der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seiner Klinik auszuführen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr. B. Luther aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation, der diese Arbeit vergeben und betreut hat und mit dessen Unterstützung ich jederzeit rechnen konnte. Ich danke ihm insbesondere für seine Geduld und für sein Bemühen, die vorliegende Arbeit zum Abschluß zu bringen. Weiterhin danke ich Ihm für das gewissenhafte Korrekturlesen der vorliegenden Dissertation und der damit verbundenen konstruktiven Kritik.

Herrn Professor Dr. G. Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf danke ich für die Überlassung seines Labors sowie für die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge, die er mir während aller Phasen dieser Arbeit gegeben hat und auf dessen Unterstützung ich immer zurückgreifen konnte.

Ich danke Frau Dr. P. Reinecke vom Institut für Pathologie der Heinrich-Heine Universität für die Durchführung und Beurteilung der histopathologischen Untersuchung der Venensegmente.

Danken möchte ich auch Professor Dr. E. Gams und seinem Team der Herz-Thoraxchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die freundliche Bereitstellung der Venensegmente.

Ich möchte mich weiterhin bei all den wissenschaftlichen Mitarbeiter/innen sowie Labormitarbeiter/innen bedanken, die mit ihrem persönlichen Einsatz an der Durchführung dieser Studie beteiligt waren.

Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation

Saklak M, Bas M, Luther B, Kojda G, Sandmann W (2001) Effects of storage solutions on endothelial and smooth muscle functions of human saphenous vein transplants. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* Vol 363:4 (abstract)

Bas M, Saklak M, Luther B, Kojda G, Sandmann W (2000) Preservation of endothelial and smooth muscle functions of human vein transplants. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* Vol 361:117 (abstract)

Luther B, Bas M, Saklak M, Kojda G, Reinecke P, Sandmann W (2002) UW-Belzer – Konservierung menschlicher Venenexplantate – eine sichere Methode bis zu 48h. *Tx Med* 14: 266 – 272.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich Muharrem Saklak, geboren am 01.06.1972, die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

Konservierung und Preservation venöser Allotransplantate mit Eigenblut und Ringer-Laktat-Lösung

Experimentelle Studie an humanem Venenmaterial

selbständig bearbeitet und verfasst sowie bisher weder an der Heinrich-Heine Universität noch an einer anderen Universität zur Promotion eingereicht zu haben.

M.Saklak

CURRICULUM VITAE

Angaben zur Person

Name	Muharrem Saklak
Geburtstag	1. Juni 1972
Geburtsort	Sungurlu/ Türkei
Staatsbürgerschaft	deutsch/türkisch
Familienstand	verheiratet und einen Sohn

Schulische Laufbahn

09/79 – 02/81	Grundschule, Sungurlu/Türkei
04/81 – 07/84	Gemeinschaftsgrundschule, Bochum
08/84 – 07/89	Helene-Lange Realschule, Bochum
08/89 – 07/93	Albert-Einstein Gymnasium, Bochum Abitur 24/06/1993

Zivildienst

01/94 - 04/95	Krankenpflege, Augusta-Kranken-Anstalten, Bochum
---------------	--

Berufsausbildung

15.04.1995	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine - Universität, Düsseldorf
04/95 – 09/97	Vorklinisches Studium: Ärztliche Vorprüfung 09/1997
10/97 – 09/01	Klinisches Studium: 1. medizinisches Staatsexamen 04/2001 2. medizinisches Staatsexamen 09/2001
10/01 – 09/02	Praktisches Jahr / Universitätsklinikum Düsseldorf
11.12.2002	3. medizinisches Staatsexamen

Beruf:

Seit 01.03.2003 Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen

Konservierung und Preservation venöser Allotransplantate mit Eigenblut und Ringer-Laktat-Lösung

Muharrem Saklak

Einleitung: Die Bedeutung allogener Venentransplantate in der Gefäßchirurgie hat durch die stark verbesserte Immuntherapie in den letzten Jahren zugenommen. Ein Kernproblem bleibt die Frage nach der optimalen Konservierung des Transplantates bis zum Operationstermin. Eine geeignete Konservierungslösung sollte den Funktionsverlust des Venenendothels auf ein Minimum beschränken. Wir verglichen in unserer Studie autologes Blut und Ringer-Lösung hinsichtlich der Fähigkeiten, die Kontraktilität des Gefäßes zu erhalten und ein gutes histomorphologisches Resultat zu erzielen.

Material und Methodik: Intraoperativ entnommene humane Vena saphena magna Segmente wurden in Ringer-Lösung (n=12) bzw. autologem Blut (n=13) für 3h, 24h, 48h, 72h, und 96h bei 4-8°C unter Lichtausschluß aufbewahrt. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Venensegment im oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer Organbad (37°C, 1g Zug) auf vasokonstriktive Aktivität durch KCl (80µM) und Phenylephrin Gabe (PE) getestet. Die endothelabhängige Vasorelaxation (EDR) wurde nach Vorkontraktion bei 0,2µM PE mit 1µM ACH getestet. Desweiteren wurde zu jedem Messzeitpunkt ein Venensegment feinpräpariert und in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurde im Rasterelektronenmikroskop (REM) der histomorphologische Endothelzustand beurteilt.

Ergebnisse: Unter KCl-Gabe zeigte die Vasokonstriktion initial keinen Unterschied zwischen Ringer und autologem Blut. Nach 72h war die Vasokonstriktion in Ringer (22,54 %, n=11) signifikant gegenüber autologem Eigenblut (73,41 %, n=12) erniedrigt. Nach 96h ergaben sich für Venen in Eigenblut (62,45 %, n=11) ebenfalls deutlich bessere kontraktile Eigenschaften als für Ringer-Venen (8,22%, n=11). Die rezeptorabhängige Kontraktion mit PE zeigte für alle verwandten Dosen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Lösungen. In unseren Ergebnissen konnten wir feststellen, dass die kontraktile Antwort, sowohl der in Eigenblut gelagerten Venen, als auch bei den in Ringer gelagerten Venen, vergleichbar bei 0,2µM und 2 µM PE war. In absoluten Zahlen zeichnete sich ein leichter Vorteil für Eigenblut-Venen ohne den statistischen Nachweis eines signifikanten Unterschieds. Wir konnten lediglich einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) für die Abnahme der Kontraktilität bei Vergleich beider Lösungen mit 20 µM PE nach 72 h (Ringer: $11,28 \pm 3,8$ mN, n=11, Eigenblut: $32,57 \pm 13,44$ mN, n=11) und 96 h (Ringer: $6,38 \pm 2,75$ mN, n=11, Eigenblut: $25,90 \pm 11,09$ mN, n=11) über die Konservierungszeit hinweg beobachten, was vermutlich durch die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren zu erklären ist. Bei keiner der Ringer-Venen war nach 48h EDR auslösbar, wohingegen unter Eigenblut-Venen eine EDR bei 3 der 5 Präparate sogar nach 72 h nachweisbar war. Histomorphologisch begutachtet zeigen Ringer-Venen bereits nach 3h auftretende Endothelläsionen. Insgesamt erzielen Eigenblut-Venen über das Lagerungsintervall histologisch bessere Resultate.

Diskussion: Die Konservierung explantierter und zur Transplantation vorgesehener humaner Venen führt zu einem Verlust der Endothelfunktion. Dies äußerte sich vor allem bei Lagerung über einem Zeitraum von mehr als 72 Stunden. Hiernach verminderten sich insbesondere die kontraktile Antwort auf α -adrenerge Stimulation und die rezeptorunabhängige Gefäßmuskelkontraktion. Auch in den REM-Aufnahmen des Endothels dokumentierte sich der Endothelverlust über die Zeit. Es zeigt sich, dass die Funktionsminderung durch Lagerung von der Aufbewahrungslösung nur in geringem Maße abhängig ist. Autologes Blut erweist sich insgesamt aber gegenüber der Ringer Lösung als vorteilhaft.