

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG- EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin

Direktor Prof. Dr. med. E. Sebastian Debus

**Mikrobiologische und histologische Evaluation von postmortal
entnommenen, aortalen Gefäßabschnitten im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

vorgelegt von:

Anke Margit Meier
aus Tübingen

Hamburg 2024

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg am: 18.12.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eike Sebastian
Debus

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2	Einleitung	7
2.1	<i>Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung humaner Gefäße in Deutschland</i>	9
2.2	<i>Allgemeine Histopathologie der humanen Gefäße</i>	12
3	Material und Methoden	14
3.1	<i>Versuchsaufbau</i>	14
3.1.1	<i>Nomenklatur</i>	16
3.2	<i>Präparationsmethodik</i>	17
3.3	<i>Mikrobiologie</i>	20
3.3.1	<i>Bakterienanzucht und Kulturmedien</i>	20
3.3.2	<i>Auswertung</i>	21
3.4	<i>Histologie/ Immunhistologie</i>	23
3.4.1	<i>Hämatoxylin- Eosin Färbung</i>	24
3.4.2	<i>Immunhistologie</i>	26
4	Ergebnisse	31
4.1	<i>Mikrobiologie</i>	31
4.1.1	<i>Quantitative Analyse</i>	31
4.1.2	<i>Qualitative Auswertung</i>	37
4.2	<i>Histologie/ Immunhistologie</i>	44
4.2.1	<i>Hämatoxylin- Eosin Färbung (HE-Färbung)</i>	44
4.2.2	<i>Cluster of Differentiation 31 (CD 31)</i>	49
4.2.3	<i>Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha)</i>	53
4.2.4	<i>4',6- Diamidin-2-phenylindol (DAPI)</i>	57
4.2.5	<i>Beispielbilder der Triplefärbung (Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha), 4',6- Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Cluster of Differentiation 31 (CD31)) für die abdominale und thorakale Aorta</i>	60
4.2.6	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)</i>	65

5	Diskussion	71
5.1	<i>Mikrobiologie</i>	71
5.2	<i>Histologie/ Immunhistologie.....</i>	77
5.2.1	Hämatoxylin- Eosin Färbung	77
5.2.2	Cluster of Differentiation 31 (CD31)	79
5.2.3	Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha)	81
5.2.4	4',6- Diamidin-2-phenylindol (DAPI).....	83
5.2.5	Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)	86
5.3	<i>Kaltlagerung in TiProtec®.....</i>	89
6	Zusammenfassung.....	90
6.1	<i>Beantwortung der aufgeworfenen Fragen</i>	90
6.2	<i>Zusammenfassung in Deutsch</i>	92
6.3	<i>Conclusion in English</i>	92
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	93
8	Anhang	97
8.1.1	Bezeichnung Versuchsgruppen	97
8.1.2	Verwendete Abkürzungen	97
9	Literaturverzeichnis	98
10	Geräte- und Materialliste	105
10.1	<i>Technische Unterstützungsprogramme</i>	105
10.2	<i>Geräte</i>	105
10.3	<i>Materialien.....</i>	106
11	Chemikalien und Antikörper	107
11.1	<i>TiProtec®.....</i>	107
11.1.1	TiProtec®- Lösung Teil 1 (100ml).....	107
11.1.2	TiProtec®- Lösung Teil 2 (3,7ml).....	107
11.1.3	HCCA Matrixlösung für MALDI- TOF Analyse	107
11.1.4	Verbrauchsfertige Lösungen und vorbereitete Versuchskits	108

12	Färbeprotokolle	110
12.1	<i>Hämatoxylin- Eosin- Färbung</i>	110
12.2	<i>Cluster of Differentiation 31- Smooth Muscle Actin alpha - Kombinationsfärbung</i>	111
13	Danksagung	114
14	Lebenslauf	115
15	Eidesstattliche Versicherung	116

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Verwendung von vaskulären Ersatzmaterialien wird in der modernen Medizin immer häufiger. Hierfür kommen sowohl synthetische wie auch biologische Materialien in Betracht, wobei sich ein Vorteil für den Einsatz von biologischen Ersatzprodukten insbesondere bei Gefäßprotheseninfektionen zeigt. Jedoch besteht aufgrund begrenzter Möglichkeiten der Entnahme und Aufbewahrung der Gefäßspende ein Ungleichgewicht der Versorgung mit biologischen Ersatzmaterialien. Bisher erfolgt die Aufbewahrung der Präparate mittels Kryokonservation, jedoch steht dieses Verfahren insbesondere in Bezug auf ausgeprägte Zellschädigung in der Diskussion. Hinzu kommt, dass eine neue Gefäßprotektionslösung TiProtec® nach neusten wissenschaftlichen Erkenntnissen eine verbesserte Option zur Kaltlagerung bietet.

Durch die gängigen nationalen und europäischen Leitlinien ist eine Entnahme von Geweben bis zu 24 Stunden postmortal erlaubt. Durch eine Erweiterung des Zeitfensters einer Entnahme scheint eine deutliche Zunahme an Gewebepräparaten möglich und das bestehende Ungleichgewicht in der Versorgung teils aufheben zu können.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Frage nach dem Zeitfenster der postmortalen Entnahme von großen Blutgefäßen eruiert werden, sowie die Frage der Kaltlagerung der entnommenen Gefäßabschnitte in der positiv beschiedenen Protektionslösung evaluiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluation einer Kaltlagerung nach direkter bzw. verzögerter postmortaler Gefäßentnahme im Mausmodell.

Folgend sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Besteht eine Veränderung der histologischen Struktur der Gefäße bei unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten mit Kaltlagerung?
2. Wie verhalten sich die Gefäßabschnitte hinsichtlich der Apoptose bzw. Nekrose?
3. Bestehen Unterschiede in den thorakalen bzw. abdominellen Aortenabschnitten?
4. Welche bakterielle beziehungsweise fungale Besiedlung besteht nach postmortaler Entnahme und unterscheidet sich diese zur direkten Entnahme bzw. in den Aortenabschnitten?

2 Einleitung

Die Verwendung von Gefäßersatzmaterialien ist in der Chirurgie bzw. Transplantationsmedizin fest etabliert.

Ein Pionier in der Gefäßmedizin hinsichtlich Transplantation war Alexis Carrel, der zu Beginn des 21. Jahrhunderts Techniken der Gefäßnaht erprobte und publizierte, wodurch die Transplantation möglich wurde.(1) Durch Jean Kunlin wurde 1948 die erste Venen Bypassoperation mit autologer Transplantation der Vena saphena magna zur Überbrückung eines Gefäßverschlusses des Oberschenkels erfolgreich am Menschen durchgeführt. (2–4)

Der Ersatz eines Gefäßabschnittes, bzw. eines ganzen Gefäßes im Rahmen einer gefäßchirurgischen Operation bzw. im Rahmen von Operationen anderer Fachbereiche wie z.B. eine Organtransplantation sind in den vergangenen Jahren etablierte Methoden im chirurgischen Alltag geworden. In Deutschland zeigte sich ein zunehmender Bedarf an Materialien und Geweben, welche als Ersatz von autologen Gefäßen zur Verfügung stehen könnten. Dieser erhöhte Bedarf ergibt sich auf der einen Seite durch die erweiterten operativen Möglichkeiten, insbesondere des Gefäßersatzes, der zunehmenden und sich beständig weiter entwickelnden operativen sowie interventionellen Therapieoptionen. Ein weiterer Aspekt ergibt sich durch den demographischen Wandel der Gesellschaft, der mit einer deutlichen Zunahme des zu erwartenden Lebensalters, und dem Wunsch nach einer individualisierten medizinischen Versorgung bei guter körperlicher und psychischer Verfassung einhergeht. Es können beispielsweise multimorbiden Patienten, die bereits einen venösen Koronarbypass erhalten haben, wenig autologe Optionen der vaskulären Rekonstruktion angeboten werden. Die Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) schätzte 2019 den Bedarf an kardiovaskulären Transplantaten auf etwa 500 Stück jährlich. (5)

In Kombination dieser Aspekte ergibt sich ein erhöhter Bedarf an Gefäßersatz Materialien, welche benötigt werden. Im Bereich des primären Ersatzes kann neben dem primären angestrebten autologen Gefäßersatz auf synthetische Materialien zurückgegriffen werden, welche als Therapieoption in der interventionellen wie operativen Therapie zur Verfügung stehen.

Mit Weiterentwicklung der Medizintechnik kamen Mitte des 21. Jahrhunderts neue, künstliche Materialien wie Polytetrafluorethylen (PTFE), auch unter dem Handelsnamen Gore-TEX (Firma GORE, Arizona, Vereinigte Staaten von Amerika) oder Teflon (DuPont, Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika) bekannt sind, vermehrt zum Einsatz. Weiter wird an der Optimierung der synthetischen Gefäß Prothesen hinsichtlich Oberflächenbeschaffenheit, Beschichtung und Infektanfälligkeit gearbeitet. Hier zeigen

sich die autologen bzw. humanen Interponaten weiterhin den synthetischen Materialien überlegen. Es besteht daher weiterhin die Indikation zum nicht- synthetischen Gefäßersatz, welche insbesondere bei Infektionen und infizierten Gefäßprothesen, wenn kein autologes Material zur Verfügung steht, besteht. Dieses Vorgehen wurde im Jahre 2020 durch die Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Gefäßchirurgie erneut bestätigt. (6) Es wird der Einsatz von Allografts als Ersatz einer infizierten Gefäßprothese im thorakalen, im abdominellen und peripheren Bereich neben der primären Empfehlung von Verwendung autologen Materials empfohlen.

Die häufigste Anwendung finden arterielle kryokonservierte Homografts als Ersatz der Aorta bei Protheseninfektionen.

In der retrospektiven Auswertung von Bisdas et al von Aorten Ersatz mittels kryokonservierten arteriellen Homografts bei 110 Patienten ergaben sich eine 3-Jahres Überlebensrate von 81% bei einem medianen Follow- up von 36 Monaten. (7) Fünf Patienten mussten aufgrund von postoperativen Blutungen, Verschluss des Homografts, einer aortoduodenalen Fistel bzw. einer aneurysmatischen Veränderung erneut operiert werden. Auch in der Auswertung von Teebken et al von aortalen Rekonstruktionen mit kryokonservierten Allografts bei mykotischen Aneurysmen und sekundär infizierten synthetischen Prothesen zeigte sich eine 30- Tage Mortalität von 14%, jedoch eine Offenheitsrate des Transplantates von 100% nach 30 Tagen und in den weiterem Beobachtungszeitraum von 97% nach drei Monaten. (8)

Die umfassendste retrospektive Aufarbeitung der Thematik stammt von der Arbeitsgruppe um Kieffer, welche die unizentrischen Patientendaten von 1988 bis 2022 auswerteten.(9) Es wurden 179 Patienten mit einer infrarenalen Aorteninfektion identifiziert. Diese Patientengruppe wurde sowohl mit Allografts wie auch im späteren Verlauf ab 1996 mit kryokonservierten Allografts versorgt wurden. In der frühen postoperativen Phase starben 36 Patienten, wobei zwei Tote auf eine Ruptur des Allograft und eine aortoenterische Fistel zurückzuführen waren. Weitere 81 Patienten starben an postoperativen Komplikationen.

Die am häufigsten beschriebenen Komplikationen sind postoperative Nachblutungen, Verschluss des Homografts, enterische Fisteln, und aneurysmatische Veränderungen. (7,8)

Die Indikationsstellung zur Verwendung humaner Gefäßersatzmaterialien wurde in den vergangenen Jahren zunehmend erweitert, bestehen blieb sie als Goldstandard bei Protheseninfektionen, dies insbesondere bei abdominellen Gefäßprotheseninfektionen.(10)

2.1 Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung humaner Gefäße in Deutschland

In Deutschland erfolgt die Gewinnung von Gefäßen hauptsächlich im Rahmen von Multiorganentnahmen, seltener im Rahmen von postmortalen Entnahmen, welche nur noch vereinzelt in wenigen Zentren durchgeführt wurden. Im Verlauf der letzten Jahre konnte die Anzahl der entnommenen kardiovaskulären Spenden leicht gesteigert werden. Bei 206 von insgesamt 5858 Gewebespenden, welche im Jahre 2019 von 2764 Menschen im Rahmen der Gewebespende durch die Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) begleitet wurden, handelte es sich um entnommene Blutgefäße. (5) Jedoch wurden sowohl vaskuläre Explantate wie auch Herzklappen subsumiert. Im Vergleich der zur Verfügung stehenden Transplantaten schätzt die DGFG den nicht vorhandenen Bedarf an humanen Gefäßspende auf ca. 60% ein. (5)

Bei Entnahme solider Organe erfolgt häufig die Explantation mit Mitgabe von iliacalen bzw. aortalen Gefäßabschnitten, welche ggf. zur Rekonstruktion im Rahmen der Organimplantation verwendet werden. Aufgrund des medizinischen Vorranges von soliden Organen für die Transplantation verbleiben daher bei multiviszeralen Resektionen wenig kaliberstarke, zusammenhängende Gefäßabschnitte zur Explantation. Auch ergibt sich durch die Zunahme des Anteils an Organspendern höheren Lebensalters mit entsprechenden kardiovaskulären Vorerkrankungen ein Anstieg an schwer bzw. nicht zu verwendenden Gefäßersatzmaterialien. Aktuell kann ein Einschluss zur kardiovaskulären Spende nur bei Spendern unter 80 Jahren mit entsprechend gutem kardiovaskulären Status vorgenommen werden.

Es zeigt sich ein Ungleichgewicht an Angeboten humaner Gefäßersatzmaterialien mit den vorhandenen Möglichkeiten der Explantation.

Ein weiterer Aspekt stellt die vorliegende Gesetzgebung des Organ- und Gewebetransplantationsgesetz (TPG) dar, welche entnommene humane Gefäße, wie auch andere Gewebespenden, dem Gewebetransplantationsgesetz einordnet und dem Arzneimittelgesetz mit unterstellt (Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz- AMG), Fassung und Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl.I.S.3394), Dritter Abschnitt- Herstellung von Arzneimitteln, §20b und §20c). (11) Die Aufbewahrung und Aufbereitung der Gewebe wird hierdurch reguliert und reglementiert. Eine simple, lokale Gefäßbank bzw. Versorgung mit entnommenen Gefäßmaterialien ist nicht möglich.

Die gesetzlichen Vorgaben hinsichtlich der Entnahme, Verarbeitung, Lagerung und Abgabe von Gefäßspende wird durch mehrere nationale wie auch internationale Gesetzestexte geregelt. Insbesondere finden das Transplantationsgesetz, das

Arzneimittelgesetz, das Transfusionsgesetz, das Infektionsschutzgesetz, die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung, die Apothekenbetriebsordnung und die Betriebsverordnung für Arzneimittelgrosshandelsbetriebe Anwendung. (12)

Im Jahre 2019 verzeichnete die DGFG fünf kardiovaskuläre Gewebekbanken in Deutschland, welche Herzklappen und Blutgefäße aufarbeiteten. Es erfolgt die Lagerung der entnommenen und fertig präparierten Herzklappen und Blutgefäße bei minus 170 Grad Celsius in flüssigem Stickstoff, diese können für bis zu fünf Jahre nach Einlagerung verwendet werden. (5)

Es besteht aktuell die Möglichkeit des Bezuges humaner Gefäßersatzmaterialien durch national bzw. international agierenden Gefäßbanken. Jedoch geht dies vermehrt mit Lieferschwierigkeiten bzw. einer hohen Planungserfordernis einher.

Insbesondere die vorliegenden gesetzlichen Vorschriften zur Gewebespende in Deutschland gestatten eine Gefäßentnahme nicht nur im Rahmen von Multiorganspenden, sondern die Entnahme von Herzklappen und Aortenwurzel bis zu 24 Stunden post- mortem, entsprechend der Empfehlung der Europäischen Union der Food Tissue Practices (EURO- GTP, Ausgabe 2007). (13) Eine Erweiterung dieses Zeitfensters auf bis zu 36 Stunden post- mortem wurde von deutschen Gewebekbanken an das Paul- Ehrlich- Institut als zuständige Bundesbehörde zu Beginn des Experimentes in Aussicht gestellt.

In der Hansestadt Hamburg wird die postmortale Gewebespende regelmäßig evaluiert und soweit möglich nach Zustimmung durchgeführt, eine aktuelle Auswertung der Praxis wurde 2020 im Rahmen einer Dissertation am Institut für Rechtsmedizin veröffentlicht. (12)

Die entnommenen Gewebe müssen innerhalb von wenigen Stunden verarbeitet, sowie anschließend in passender Kryokonservation überführt werden. (10) Dieses Verfahren wird zurzeit als Standard der Lagerungsmöglichkeiten von Gefäßspende gesehen bzw. durchgeführt. (10,14–16)

Von medizinischer Seite sind die Offenheitsrate, die Degeneration des Transplantats, die Aneurysmabildung, die Thrombosierung beziehungsweise das primäre Transplantatversagen sowie die Infektionsrate wesentliche Parameter, die über die Qualität des Gefäß Transplantates entscheiden.

In der Literatur gibt es wenig wissenschaftliche Aufarbeitungen hinsichtlich dieser Ziele in Bezug auf die Lagerung der Gefäße.

Im Jahre 2000 berichteten Albertini und Kollegen über die Langzeitresultate nach arterieller Rekonstruktion bei beinerhaltenden Operationen im Rahmen von kritischen Ischämien Implantation mit arteriellen Allografts über eine Offenheitsrate von 83,3%

nach 30 Tagen. Nach einem Jahr lag diese bei 48%, bis hin zu einer Offenheitsrate nach 5 Jahren von 16%. Die sekundäre Offenheitsrate lag nach ein bzw. fünf Jahren bei 59% bzw. 25%. (17) Es wurden sowohl kryokonservierte als auch kalt gelagerte Präparate verwendet. In der Subgruppenanalyse ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Offenheitsraten. Alle Gefäße wurden im Rahmen von Multiorganspenden entnommen. Es folgte die Kaltlagerung der Gefäße bei vier Grad Celsius in der initialen Lagerungslösung für bis zu 40 Tage.

Zum Zeitpunkt dieser Publikation wurde die Methodik der Kryokonservierung zunehmend durchgeführt, sodass von einer sequenziellen Analyse auszugehen ist.

Jedoch steht das Konservierungsverfahren weiterhin in der Diskussion, da die Kryokonservierung als zellschädigend, einige Konservierungszusätze sogar als zytotoxisch gelten. Eine Gegenüberstellende Aufarbeitung der Konservierungsverfahren findet sich nur unzureichend in der Literatur, insbesondere nicht mit modernen Lagerungslösungen.

Derzeit sind neue Protektionslösungen, die sich vermehrt der Verhinderung der Zytotoxizität und des Erhalts des Endothels und des glatten Muskelzellverbandes widmen Gegenstand verschiedener Forschungsgruppen.

Durch die Firma Köhler Chemie (Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim) wurde die Lagerungslösung TiProtec® entwickelt, welche zur Spülung, zur Kaltlagerung sowie zum Transport von Blutgefäßen (Arterien und Venen) im Rahmen von chirurgischen Eingriffen sich eignet. Hierbei handelt es sich um eine Kombination einer balancierten Elektrolyt Lösung, welche mit Glucose kurz vor Verwendung gemischt wird. ((18–21). (Die zum Zeitpunkt der Experimente zur Verfügung gestellte Versuchslösung TiProtec® von Köhler Chemie kann im Absatz 11.1. TiProtec® eingesehen werden). Zur Verwendung der Lösung kam es aufgrund der folgenden vorliegenden Untersuchungen. Garbe et. al. konnten eine verbesserte längere Kaltkonservierung der Gefäße mittels der Lösung TiProtec® nachweisen (21). Anschließend folgt eine Lagerung der Gefäße bei 6 bis 8 Grad Celsius. Die neu entwickelte Konservierungslösung TiProtec® zeigte in der Lagerung der A. mammaria über 14 Tage eine deutlich verbesserte Funktion der glatten Muskulatur und eine längere Präservierung des Endothels als in bisher verfügbare Lösungen. Im Jahre 2011 publizierte die Forschungsgruppe um Ebner und Deussen die Funktionsfähigkeit von thorakalen Aortenabschnitten von männlichen Wistar Ratten. (22) Es zeigte sich eine gute Funktion nach bis zu 2h postmortaler Lagerung in der Versuchslösung, jedoch eine deutlich erschwerte Funktionsstimulation nach 6 Stunden.

Weiterhin zeigten Wilbring und Kollegen einen Vorteil der Gefäßwandspannung nach Lagerung von kardiale verwendeten Gefäß Interponaten in TiProtec®. (23)

Die bislang etablierte Methodik der Wahl bleibt die Konservierung von Gefäßen mittels Kryokonservierung, die, insbesondere in der Präservation solider Organe durchgeführte Kaltlagerung in Lösungen, wird bislang in Deutschland für Gefäßpräparate bisher nicht durchgeführt. (10,24)

Die bestmögliche Erhaltungsmethodik steht weiter in der internationalen Diskussion. Aufgrund neuer Studiendaten, mit teilweise neuen Konservierungslösungen wurde diese Diskussion auch in Deutschland bzw. Europa erneut entfacht.

In Zusammenschau besteht ein deutlicher Bedarf an humanen allogenen Gefäßersatzmaterialien, welcher aktuell durch die bekannten Gewebespenden nicht adäquat gedeckt werden kann. Weiterhin ergibt sich aufgrund der aufwändigen Präparation und Lagerung der Gefäße die Fragestellung, ob diese durch eine Wiederaufnahme von vereinfachten Lagerungsmöglichkeiten mit neuen, physiologischeren Konservierungslösungen lokaler und praktikabler möglich wäre. Eine Alternative zur bereits etablierten Kryokonservation, welche aktuell hauptsächlich in Deutschland Anwendung findet, wäre unter Umständen hilfreich und könnte gegebenenfalls die Versorgungslücke minimieren. (10)

2.2 Allgemeine Histopathologie der humanen Gefäße

2.2.1.1 Histologie

Der Aufbau von großen und kleinen Gefäßen der Säugetiere stimmen histologisch-anatomisch weitgehend überein, sodass murine Gefäße als Standardvariante in der experimentellen Forschung Verwendung finden.

Gefäße fungieren in Säugetieren als Transportwege des Blutes, sowohl des sauerstoffangereicherten als auch des sauerstoffarmen Blutes. Es können zum Herzen hinführende Gefäße, zumeist Venen genannt, und vom Herzen wegführende Gefäße, Aorta und Arterien genannt, unterschieden werden.

Der Grundaufbau von arteriellen Gefäßen besteht aus einer einzelligen inneren Schicht, zumeist Endothel beziehungsweise Intima (Tunica intima) genannt, welcher eine elastische innere Membran (Membrana elastica interna) umgibt. Hierauf folgt eine muskuläre und kollagenhaltige Schicht, zumeist als Media (Tunica media) tituiert. Als drittes Segment liegt die Adventitia (Tunica adventitia) der Media auf, welche hauptsächlich aus Bindegewebe besteht.(25)

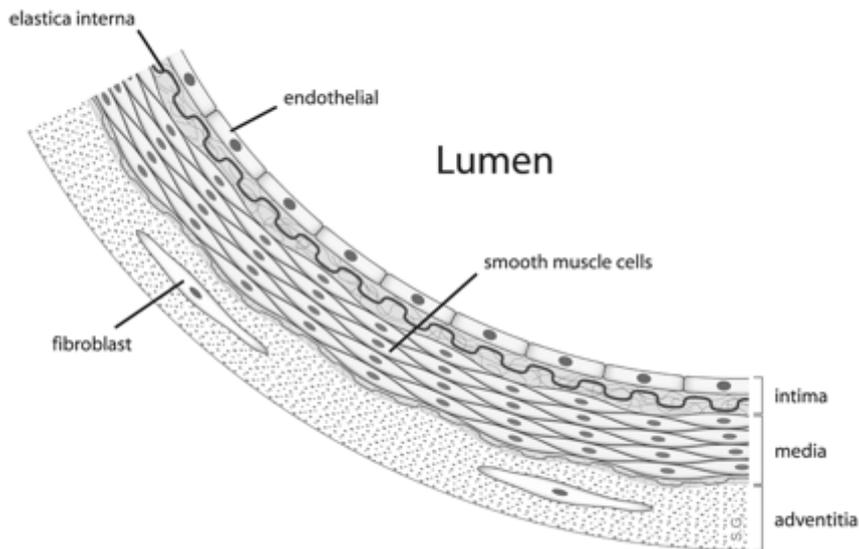


Abbildung 1 - Schematischer Aufbau einer Gefäßwand (Anatomy overview of a human artery-gezeichnet für eine Doktorarbeit. Maastricht, November 2005. Stijn A.I. Ghesquiere) (25)

Bedingt durch die unterschiedlichen physiologischen Anforderungen zeigen die verschiedenen Gefäßabschnitte eine unterschiedliche Ausprägung der einzelnen Schichten der Gefäßwand.

Als Ersatzverfahren im klinischen Alltag finden insbesondere Arterien bzw. die Hauptschlagader/ Aorta Verwendung. Innerhalb der Arterien beziehungsweise innerhalb der Aorta lassen sich weitere Unterschiede im histologischen Aufbau der Gefäße ausmachen, welche insbesondere in den unterschiedlichen embryonalen Ursprüngen und den physiologischen Anforderungen begründet sind. (26) Der thorakale Abschnitt der Aorta erfüllt in ihrem histologischen Aufbau die Funktion eines Windkessels, indem sie durch insbesondere kollagene Fasern in der Media eine Speicherung des ausgeworfenen Blutes und den somit kontinuierlichen Abfluss gewährleistet. In der abdominalen Aorta überwiegen muskuläre Fasern in der Tunica media, welche eine schnellere Veränderung des Durchmessers zulassen und somit dynamisch auf die Kreislaufsituation reagieren können. (27)

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Der Start der experimentellen Phase erfolgte nach positiver Bewilligung des Tierversuchsantrages nach Paragraph 4 des Tierschutzgesetzes (in der Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1207, 1313), zuletzt geändert durch das Gesetz vom 15. 2009 (BGBl. IS.1950)) durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg in der Mitteilung vom 03.05.2011 unter dem Projekttitel "Erkrankungen der Blutgefäße im Mausmodell" (Antragstellung durch Dr. Markus Geissen, Universitäres Herzzentrum Hamburg, Labor der Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, Projektnummer OR 6553).

Für den Versuchsaufbau wurden insgesamt 40 männliche C57Bl/6J Mäusen (*Mus musculus*) mit einem Alter von elf Wochen vorgesehen. Es erfolgte die randomisierte Einteilung der Tiere in vier Versuchsgruppen, welche sich in den Entnahmezeitpunkten sowie der Art und Lagerung der entnommenen Blutgefäße unterschieden. Pro Gruppe wurden jeweils 10 Versuchstiere randomisiert.

Es erfolgte die Unterscheidung des Entnahmezeitpunktes der Aorta abdominal und thorakal direkt postmortal und verzögert nach 36 Stunden nach Lagerung bei Raumtemperatur, nach der Euthanasie. Jeder Versuchsgruppe wurden 20 Tiere zugeordnet. (Tabelle 1- Übersicht der Versuchsgruppen, Anzahl Versuchstiere (Hausmaus/ *Mus musculus*), Differenzierung nach Entnahmezeitpunkten und Kaltlagerungsdauer)

Gemäß standardisiertem Protokoll erfolgte die Entnahme der gesamten thoracoabdominalen Aorta, welche für die weiteren Verarbeitungsschritte in einzelne Abschnitte getrennt, separat behandelt und ausgewertet wurden.

Die entnommenen Gefäßabschnitte wurden in 1,5 ml Versuchslösung TiProtec® (Chargennummer 12152X1, Inhaltsstoffe Siehe Anhang) der Firma Köhler Chemie verbracht, mit folgender Kaltlagerung für drei Wochen bei 2-6 Grad Celsius (Kühlschrank, Firma Liebherr, CP 3813 Index 21C/001) vorgenommen.

Die 10 weiteren entnommenen Aortenabschnitte wurden kurzzeitig in Ringerlösung® (Fa. Braun) gelagert, jedoch direkt den entsprechenden Untersuchungsmedien zugeführt. (28)

Tabelle 1- Übersicht der Versuchsgruppen, Anzahl Versuchstiere (Hausmaus/ Mus musculus), Differenzierung nach Entnahmezeitpunkten und Kaltlagerungsdauer

Gruppe	Anzahl Mus musculus (C57Bl/6J)	Entnahmezeitpunkt der Aorta nach Lagerung bei Raumtemperatur (in Stunden postmortal)	Dauer der Kaltlagerung der Gefäße in TiProtec® bei 2-6° (in Wochen)
1	10 Tiere	Keine	Keine
2	10 Tiere	Keine	3 Wochen
3	10 Tiere	36 Stunden	Keine
4	10 Tiere	36 Stunden	3 Wochen

Nachfolgend wurden die randomisierten Proben in folgenden methodisch differierenden Analysespuren fortbehandelt.

Aufgrund der oben genannten histologischen Unterscheidung der Gefäß Matrix (siehe histologischer Aufbau der Gefäße) im thorakalen gegenüber dem abdominalen Aortenabschnitt, sowie der möglicherweise differierenden bakteriellen Besiedlung wurde sich zur separaten, gleichlaufenden Untersuchung des thorakalen und des abdominalen Aortenabschnittes entschieden.

3.1.1 Nomenklatur

Im Folgenden soll die verwendete Nomenklatur aufgezeigt werden. Die Zusammensetzung der Bezeichnung besteht aus der Differenzierung des Aortenabschnittes, es wurde die Aorta thoracalis (AT) und die Aorta abdominalis (AA) unterschieden. Die folgende erste Ziffer entspricht dem Entnahmezeitpunkt postmortal (in Stunden), die zweite Ziffer ergibt die Lagerungsdauer des Gefäßabschnittes in der Versuchslösung TiProtec® (in Wochen).

Tabelle 2- Nomenklatur Versuchsgruppen

Aorten-Abschnitt	Entnahmezeitpunkt postmortal	Kaltlagerungsdauer in TiProtec® (bei 2-6 Grad Celsius)	Nomenklatur (Aortenabschnitt/ Entnahmezeitpunkt/ Lagerungsdauer)
Aorta thoracalis (AT)	0 Stunden	0 Wochen	AT 0/0
		3 Wochen	AT 0/3
	36 Stunden	0 Wochen	AT 36/0
		3 Wochen	AT 36/3
Aorta abdominalis (AA)	0 Stunden	0 Wochen	AA 0/0
		3 Wochen	AA 0/3
	36 Stunden	0 Wochen	AA 36/0
		3 Wochen	AA 36/3

3.2 Präparationsmethodik

Die Entnahme der Gefäßabschnitte zur weiteren experimentellen Untersuchung wurde gemäß folgendem Präparationsprotokoll standardisiert durchgeführt.

Die Versuchstiere, männliche, elf Wochen alte C57Bl/6J Mäuse wurden mit einem Sauerstoff- Kohlenstoffdioxid- Gemisch betäubt und folgend durch zervikale Dislokation getötet. Nach gewissenhafter Prüfung des eingetretenen Todes erfolgte die Fixierung der Maus in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte mit Klebestreifen.

Nach Desinfektion mit 80% Alkohol erfolgte die Eröffnung der Haut mit einem kurzen medial- abdominal Schnitt mittels Schere und anatomischer Pinzette. Durch die stumpfe Ablösung der Haut vom Unterhautfettgewebe stellte sich die verschlossene Abdominal- und Thoraxhöhle dar, welche mit einem medianen Längsschnitt cervico- pelvin eröffnet wurde. Durch Erweiterung des Schnittes am Rippenbogenrand und Durchtrennung der Rippen wird das Rippenschild lateral aufgeschnitten und nach links kranial abgehoben. Mit der feinen Präparationsschere erfolgte die Blutentlastung über den rechten Vorhof. Anschließend erfolgte die Perfusion des Gefäßsystems mit 10 ml gekühlter Ringer ®- Perfusionslösung (Firma Braun (28)) über den rechten Vorhof mittels einer 22 Gauge peripheren Venenverweilkanüle entsprechend einem 0,6mm Innendurchmesser Lumen (Vasofix Safety, 0.90x25mm, G22, blau, Firma Braun). Das Blut wurde in einer Hartplastikschale aufgefangen und verworfen. Kontrolle der Perfusionsqualität durch die Perfusion der Leber, und folgende Mobilisation der Leber und der inneren Organe nach rechts und die Geschlechtsorgane nach extrakorporal bzw. kaudal, sodass der Blick auf das Retroperitoneum frei wird. Ebenfalls Mobilisation der thorakalen Organe, die Lungen und das Herz nach cranial bzw. rechts kranial luxiert.

Es erfolgt die vorsichtige, schichtweise Präparation der Aorta thoracalis (Abbildung 2- Präparation der thorakalen Aorta (Sternmarkierung)) und schichtweises Ablösen der umgebenden bindegewebigen Strukturen, gefolgt durch das Ablösen der thorakolumbalen Seitenäste der Aorta.

Abdominal wurde das Retroperitoneum eröffnet und die Aorta abdominalis (Abbildung 3- Präparation der abdominalen Aorta (Sternmarkierung)) und folgenden vaskuläre Abgänge von der umgebenden Bindegewebsschicht befreit. Auch erfolgt die Präparation unter maximaler Schonung des Gefäßes.

Die Entnahmehöhe des Gefäßes wird durch den letzten Abgang des Aortenbogens, sowie des Zwerchfelldurchtritts für den thorakalen Anteil bestimmt. Folgend wird der abdominelle Abschnitt ab Höhe des Zwerchfelldurchtritts bis zur Bifurkation der Iliacalgefäße entnommen.

Zur besseren Veranschaulichung des vaskulären Abschnittes wurde einmalig die komplette aortalen Achse präpariert und gezeigt (Abbildung 4- Abdomino- Thorakales Gefäß Präparat)

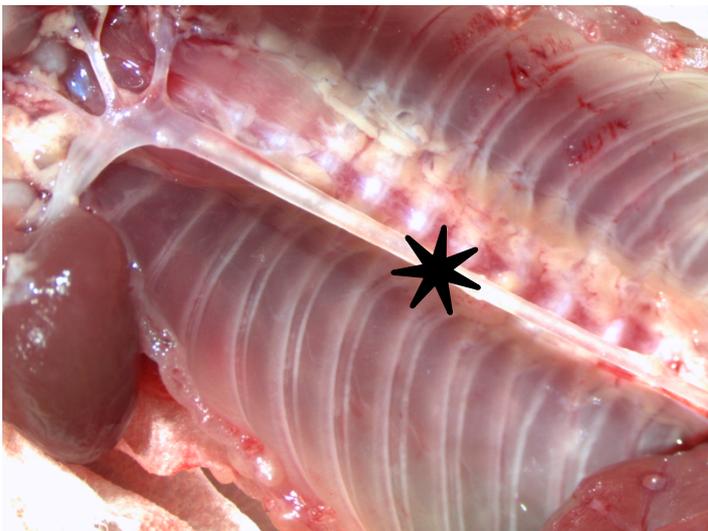


Abbildung 2- Präparation der thorakalen Aorta (Sternmarkierung)

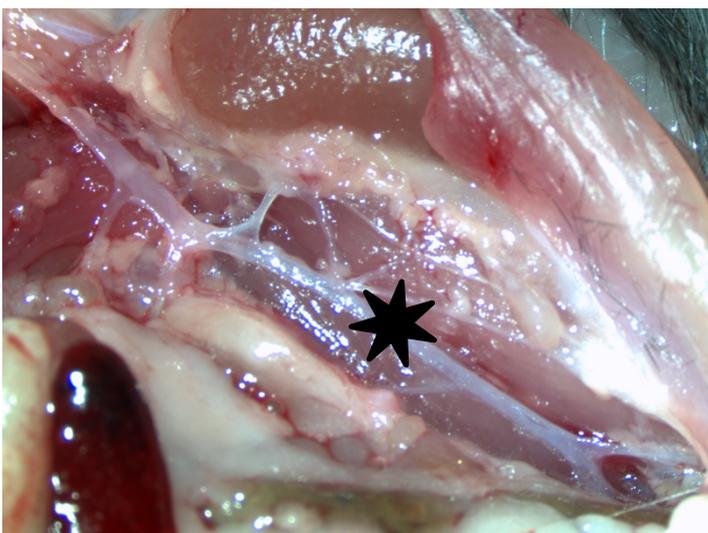


Abbildung 3- Präparation der abdominalen Aorta (Sternmarkierung)



Abbildung 4- Abdomino- Thorakales Gefäß Präparat

Nach chirurgischer Trennung des abdominalen und thorakalen Aortenabschnittes voneinander erfolgt die separate Lagerung der Gefäßabschnitt gemäß Randomisierung in 1,5ml frischer TiProtec® (Firma Köhler Chemie) - Lösung für die folgende Kallagerung, beziehungsweise in 1,5 ml Ringer® Lösung (Firma Braun(28)).

Die verwendete Versuchslösung TiProtec® wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland täglich neu unter sterilen Bedingungen angesetzt. Hierbei wurde für die benötigte Menge Grundlösung (Lösung Teil 1, siehe Anhang) mit der entsprechenden anteiligen Lösungsmenge der 5%-tigen Glucose Lösung (Lösung Teil 2, siehe Anhang) hinzugefügt.

Nach Beendigung der jeweiligen Lagerungsdauer erfolgte unter sterilen Bedingungen auf der Werkbank die Teilung der Aorta mit einem Skalpell in gleich große Anteile und die Überführung der Abschnitte in die jeweiligen Medien zur weiteren Verarbeitung.

Zur mikrobiologischen Untersuchung wurden die Gefäßabschnitte wieder in das ursprüngliche Reaktionsgefäß zurückgegeben und in die entsprechende Lagerungslösung zurückgegeben. Zur histologischen Aufarbeitung erfolgte die Fixierung in 1ml gepuffertem 4% Formalin.

3.3 Mikrobiologie

Im Rahmen der weiteren Untersuchung sollte die Quantität und Qualität der mikrobiellen Besiedelung untersucht werden, zur Abschätzung einer möglichen Kontamination bzw. Selektion von Bakterienspecies.

Zur weiteren Aufarbeitung einer mikrobiellen Besiedlung der Gefäß Abschnitt zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, wurde die randomisierte Probe des jeweiligen anatomischen Abschnittes des Gefäßes mit darin enthaltender Lagerungsflüssigkeit der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt.

3.3.1 Bakterienanzucht und Kulturmedien

Ein Teil des Gefäßabschnittes wurde an der Wand des Reaktionsgefäßes mit einem Glasstab verrieben, wodurch sich eine neue Suspension ergab. Nach Abflammen des Glasstabes unter dem Bunsenbrenner erfolgte die Auftragung von je 20µl der entstandenen Suspension auf jeweils drei nicht selektive Universalnährböden und der Ausstrich in der Drei- Ösen-Technik. Zur Inkubation wurden die Böden bei 38±2 Grad Celsius, entsprechender der Körpertemperatur des Versuchstieres, für 48 Stunden gelagert.

Gemäß der etablierten, klinischen Routine erfolgte der Einsatz von Universalnährböden, da ein Großteil der Mikroorganismen ein gutes Wachstum zeigt. Verwendet wurden pro ausgestrichene Probe jeweils ein Blutagar(29) , ein Kochblutagar(30) und ein Schaedler Agar(31).

Blutagar: Der verwendete Agar enthält 5-10% steriles, defibriertes Blut, zumeist Schafsblut. Durch die unterschiedlich hämolysierenden Eigenschaften der Bakterienstämme finden sich anschließend die Kolonien umgebende farbige Höfe, welche bereits für bestimmte Bakterienstämme charakteristisch sind. (29)

Alpha Hämolyse: Um die Kolonie lässt sich ein grünlicher Hof erkennen. Dies deutet darauf hin, dass das vorzufindende Bakterium vorhandenes Hämoglobin in Methämoglobin oxidiert. Die grünliche Farbe entsteht durch die weitere Umwandlung zum Sulfhämoglobin. Innerhalb des grünen Hofes lassen sich vereinzelt nicht lysierte Erythrozyten finden.

Beta Hämolyse: Stellt sich durch einen weißen, die Kolonie umgebenden Hof dar. Es findet eine vollständige Hämolyse der Erythrozyten statt.

Gamma Hämolyse: Die Kolonien werden durch keinen erkennbaren Hof umgeben. Es besteht keine Hämolyse.

Der Blutagar findet insbesondere Anwendung in der nicht spezifischen Isolation und Kultivierung von aeroben Bakterienspecies.

Kochblutagar: Durch das Abkochen des oben beschriebenen Blutagar kommt es zur Hämolyse. Hierdurch findet sich Faktor V (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, NAD) und Faktor X (Hämin) direkt im Agar. Eine direkte Metabolisierung ist somit von Bakterienstämmen möglich, welche selbst keine blutlysierende Funktion besitzen. Dieser Agar wird in der nicht spezifischen Isolation und Kultivierung von aeroben Bakterienspecies verwendet. (30)

Schaedler- Agar: Stellt ein optimales Nährmedium für anaerobe Bakterienstämme dar. Die Entwicklung des Agar erfolgte nach entsprechender Formulierung durch Schaedler und Mitarbeiter und folgender Modifikation durch Mata.(31–33)

3.3.2 Auswertung

Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte die manuelle Auswertung der Agarplatten. Es wurde primär eine quantitative Bestimmung mittels Auszählung der Anzahl der Kolonien pro Platte durchgeführt.

Nach numerischer Auswertung der Kolonien bildenden Einheiten (KBE) wurde zur Vereinfachung der weiteren Auswertung eine im klinischen Alltag ebenfalls etablierte Einteilung Anhand der Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten (KBE) in drei quantitative Gruppen vorgenommen.

In der Auswertung erfolgte die Zählung derselben Bakterienspezies, welches sich auf mehr als einer Agarplatte desselben Gefäßabschnittes nachzuweisen war, als eine Kolonie bildende Einheit. (Tabelle 3- Quantitative Einteilung der Kolonien bildenden Einheiten (KBE)).

Tabelle 3- Quantitative Einteilung der Kolonien bildenden Einheiten (KBE)

Bewertung des Wachstums	Anzahl der Kolonien bildende Einheiten (KBE)
Vereinzelt	1-9
Mittel	10-49
Reichlich	> 50

Zur Negativkontrolle der verwendeten Lagerlösung TiProtec® erfolgte ebenfalls das Ausstreichen jeder täglich neu angesetzten Lagerlösung auf allen drei Agarplatten.

Die quantitative Auswertung erfolgte in zwei Abschnitten. Zum einen wurde eine Darstellung der quantitativen Anzahl an Kolonien bildenden Einheiten abgebildet. Es erfolgte die Gesamtauswertung über die Versuchsgruppe. In der zweiten Auswertung wurde die maximale Anzahl an Kolonien bildenden Einheiten pro einzelner Versuchsprobe der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Eine qualitative Auswertung einzelner Kolonien erfolgt mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/ Ionisation- Time of Flight Analyse (MALDI- TOF). Dafür wurde von der jeweils zu untersuchenden Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher eine geringe Menge auf eines der zur Verfügung stehenden Probenfeld einer 48 Lock Metallplatte (MSP 96 micro Scout target ground steel) aufgebracht. Nach dem Antrocknen der Probe wurde diese mit 1,5 µl HCCA-Matrixlösung fixiert. Nach Kristallisation der Matrix für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Analyse im Massenspektrometer Bruker Daltronics microflex LT.

Die festgestellten Bakterien-species wurden zusammengefasst für die jeweilige Gruppe mit der Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten ausgewertet. Weiterhin wurde eine Auswertung hinsichtlich der Eigenschaften der Bakterien-species, wie zum Beispiel der Gram-Färbung, der Sauerstofftoleranz, der Morphologie und des bekannten Besiedlungsraumes erhoben.

Die oben beschriebene Auswertung wurde separiert für den jeweiligen abdominalen und den thorakalen Aortenabschnitt durchgeführt.

Auf den verwendeten Agar Platten wird im Rahmen der Routineuntersuchung ein Wachstum von fungalen Erregern festgestellt, auf eine selektionierte Untersuchung bzgl. spezifischen Pilzwachstums wurde, bei nicht ausreichender Erwartung eines fungalen Wachstums, verzichtet.

3.4 Histologie/ Immunhistologie

Zur Aufarbeitung von histologischen Veränderungen und Prozessen erfolgte die Analyse mittels standardisierter Färbemethoden, es wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung und die spezifische Gewebefärbung durchgeführt.

Zur detaillierten Analyse erfolgten weitergehend die Spezialfärbungen der glatten Muskelzellen (SMA alpha), des Endothels (CD31), der Zellkerne (DAPI) und der in Apoptose befindlichen Zellen mittels TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling) Färbung. Alle Färbungen wurden gemäß laborinternem und herstellergerechtem Protokoll durchgeführt.

Die in gepuffertes Formalin eingelegten Gefäßpräparate wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin überführt (siehe Anhang Histologische Färbeprotolle). Unter Zuhilfenahme einer Paraffiniermaschine, welche das heiße Paraffin in die vorbereiteten Einbettkästchen gab, wurden die Präparate in Paraffinblöckchen der Größe 1,5x1cm eingebettet. Jedes Gefäß wurde vor der Einbettung halbiert und senkrecht zur Oberfläche aufgestellt. Jeweils zwei Proben derselben Gruppe wurden miteinander in einem Paraffinblöckchen fixiert.

Nach ausreichender Abkühlung der Paraffinblöckchen erfolgte das Erstellen der Feinschnitte mit dem Mikrotom von Reichert Jung, Hn 40 (55160). Nach Ablage der Feinschnitte, in einer Schnittdicke von ca. 5-10µm im warmen Wasserbad und anschließendem Aufnehmen vom jeweils drei bis vier Paraffinschnitten pro Paraffinblöckchen auf einen vorbeschrifteten Objektträger, werden diese zum Trocknen an der Luft aufgestellt.

Es befinden sich somit vier bis sechs Anschnitte eines Gefäßes auf einem Objektträger, welcher weiteren histopathologischen Untersuchungen zugeführt wurde.

3.4.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung

Zur allgemein histologischen und gesonderten autolytischen Bewertung der Präparate erfolgt die Hämatoxylin- Eosin Färbung.

Hämatoxylin- Eosin Färbung: Hämatoxylin, färbt basophile Strukturen wie die DNA blau an. Hierdurch lassen sich insbesondere der Zellkern und das an Ribosomen reiche raue Endoplasmatische Retikulum darstellen. Das Eosin färbt als saurer Farbstoff hingegen basische Zellbestandteile, wie zum Beispiel Zellplasmaproteine, Mitochondrien oder das glatte endoplasmatische Retikulum und Kollagen, rot an. Verwendet wird diese Färbung zur allgemeinen pathologischen Beschreibung von Präparaten.

Für die weitere Präparation erfolgt die schrittweise Deparaffinierung der Proben in organischen Lösungsmitteln. Nach dreimaliger Gabe der Objektträger in Xylol 1-3%, folgt das Überführen in Ethanol 100%, mit absteigender Folge in Ethanol 96%, Ethanol 70% und schlussendlich Ethanol 50% für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend werden die Objektträger in destilliertem Wasser für ebenfalls 5 Minuten gelagert, bevor sie der folgenden Färbung zugeführt werden. Es folgte das Einfärben der Präparate mit einer verdünnten Hämatoxylin Lösung für eineinhalb Minuten, gefolgt von einem Ausspülen mit fließendem destilliertem Wasser für zehn Minuten. Hiernach werden alle Objektträger für zehn Minuten mit Eosin eingefärbt. Nach Auswaschen mit Ethanol 96%, Ethanol 100%, und Xylol 1-3% werden die Präparate mit Eukitt eingedeckt und im abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Abschließend werden die gefärbten Objektträger mit Deckgläschen zugedeckt. Es erfolgt die Abbildung und Speicherung der Photographien durch das Auflichtmikroskop von Zeiss Standard 25 (45VA, Typ B). Die Auswertung nach unten aufgeführten Kriterien wurde verblindet durchgeführt. Eine Fotodokumentation erfolgte für diese Färbung nicht.

Dafür werden zwei Auswertungsparameter der histopathologischen Beurteilung festgelegt. Der erste Parameter beschreibt die Stromadegeneration, welche als ein Abblassen der Bindegewebsfasern und deren Strukturverlust im Rahmen der stattgehabten Autolyse widerspiegelt.

Es erfolgte die quantitative Einteilung in vier Degenrationsgrade. Der Degenerationsgrad null beziffert keine Veränderung, Grad eins beschreibt fokale, kleine Degenerationsareale, Grad zwei beinhaltet konfluierende Degenerationsherde, Grad drei eine totale Degeneration der gesamten Bindegewebsstruktur (Tabelle 4- Quantitative mikroskopische Einteilung der Stromadegeneration in der konventionellen histologischen Aufarbeitung).

Tabelle 4- Quantitative mikroskopische Einteilung der Stromadegeneration in der konventionellen histologischen Aufarbeitung

Stromadegeneration	Grad	Degeneration der Bindegewebsstruktur
Keine	0	Keine Änderung
gering	1	fokale, kleine Degenerationsareale
mäßig	2	konfluierende Degenerationsherde
hochgradig	3	totale Degeneration der gesamten Bindegewebsstruktur

Als zweiter histopathologischer Parameter wurde die Abblassung der Zellkerne definiert, deren Ausprägung insbesondere mit zunehmender Autolyse korreliert. Je fortgeschrittener die Autolyse, umso blasser färben sich die Zellkerne an, bis die Kernfärbung vollständig verschwindet. (Tabelle 5- Quantitative mikroskopische Einteilung der Zellkernabblassung in der konventionellen histologischen Aufarbeitung)

Tabelle 5- Quantitative mikroskopische Einteilung der Zellkernabblassung in der konventionellen histologischen Aufarbeitung

Abblassung Zellkerne	Grad	Prozentualer Anteil an abgeblassten Zellkernen des Präparates
keine	0	keine
Gering	1	Bis zu 10%
Mäßig	2	10-50%
Mäßig- hochgradig	3	50-80%
Hochgradig	4	Über 80%

3.4.2 Immunhistologie

3.4.2.1 Triplefärbung: Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha), 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Cluster of Differentiation 31 (CD31)

Mit der Triplefärbung sollten 3 histologische Darstellungen in einem zur Geltung kommen. Die Visualisierung der glatten Muskelzellen erfolgt mittels Anfärbung der Smooth muscle actin alpha (SMA alpha), der Endothelzellen mit dem Cluster of Differentiation 31 (CD31) und der Zellkerne mit der 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung. Somit sollte eine Aussage über die Zellzahl, die Integrität des Endothels und der glatten Muskelzellen der muskulären Gefäßschicht der Media getroffen werden.

Die Präparation der Objektträger, für die weiter immunhistochemische Färbung erfolgt, wie bereits im Punkt Histologie beschrieben, mittels einer absteigenden Alkoholreihe zur Deparaffinierung.

Pro Versuchspräparat wird auf jedem Objektträger nach Standard eine Negativprobe auf den verwendeten Tris Buffered Saline Puffer (TBS-Puffer), sowie eine negative Probe für die Reaktion mit dem Sekundärantikörper mitgeführt.

Nach erfolgter Entparaffinierung durch die absteigende Alkoholreihe und Auswaschen mittels Tris Buffered Saline Puffer (TBS-Puffer), erfolgte ein Antigen-Retrieval mittels kochendem Citratpuffer bei einem pH von 6,1 für 40 Minuten, anschließend für circa 20 Minuten erst bei Raumtemperatur und nach ausreichender Abkühlung auf Eis gekühlt. Es erfolgt eine dreifache Reinigung für jeweils 5 Minuten mit TBS-Puffer. Nachdem die Proben mit Fettstift (Dako Pen, Dako) umrandet wurden, erfolgt die Hinzugabe des Primärantikörpers für glatte Muskelzellen „smooth muscle actin alpha“ (SMAalpha, F3777, Sigma Aldrich). Dieser Primärantikörper ist bereits für den weiteren Versuch mit Fluorescein isocyanat (FITC)-Antikörper markiert. In der Verdünnung 1:500 mit Antibody diluent (Invitrogen) erfolgt der Ansatz, der für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Darauf erneut das dreimalige Waschen der Proben für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer. Nun wird der zweite Primärantikörper, zur Darstellung der Cluster of Differentiation 31 positiven Zellen, „rabbit-anti-mouse CD31 Antigen“ (ab28364, Abcam) aufgetragen. Die Inkubation erfolgt in der Verdünnung von 1:50 mit Antibody diluent über Nacht bei 4 Grad Celsius.

Anschließend folgt das dreimalige Waschen mit TBS-Puffer für jeweils 5 Minuten an. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgt die Inkubation des Sekundärantikörpers „donkey-anti-rabbit-Immunglobulin G-Alexa Fluor 594“ (Invitrogen), zur Darstellung der CD 31 Zellen, in der Verdünnung 1:400 mit Antibody Diluent für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in TBS-Puffer für je 5 Minuten erfolgt die Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Roth) in der Konzentration 1µg/ml für 1min bei

Raumtemperatur. Vor dem Eindecken der Objektträger mit Deckgläschen werden die Färbungsrückstände durch dreimaliges Waschen in TBS-Puffer gereinigt. Die Deckgläschen (Marienfeld) werden mit Fluoromount (Southern Biotech) aufgebracht und die Objektträger folgend bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

Aus dieser Färbung lassen sich im Fluoreszenzmikroskop (BZ-V800, Firma Keyence) bei 589 nm Lichtlänge die glatte Muskulatur (SMA alpha) in grün, das Endothel (CD31) in rot und die Zellkerne in blau darstellen. Es wurden folgende Belichtungszeiten verwendet: DAPI-Färbung 1/55 Sekunden, SMA alpha Färbung 1/18 Sekunde, und für die CD 31 Färbung 1/4 Sekunde.

Alle mitgeführten Negativproben und Isotypenprotokolle waren negativ.

Eine exemplarische Darstellung der Färbung findet sich in der untenstehenden Abbildung 5.

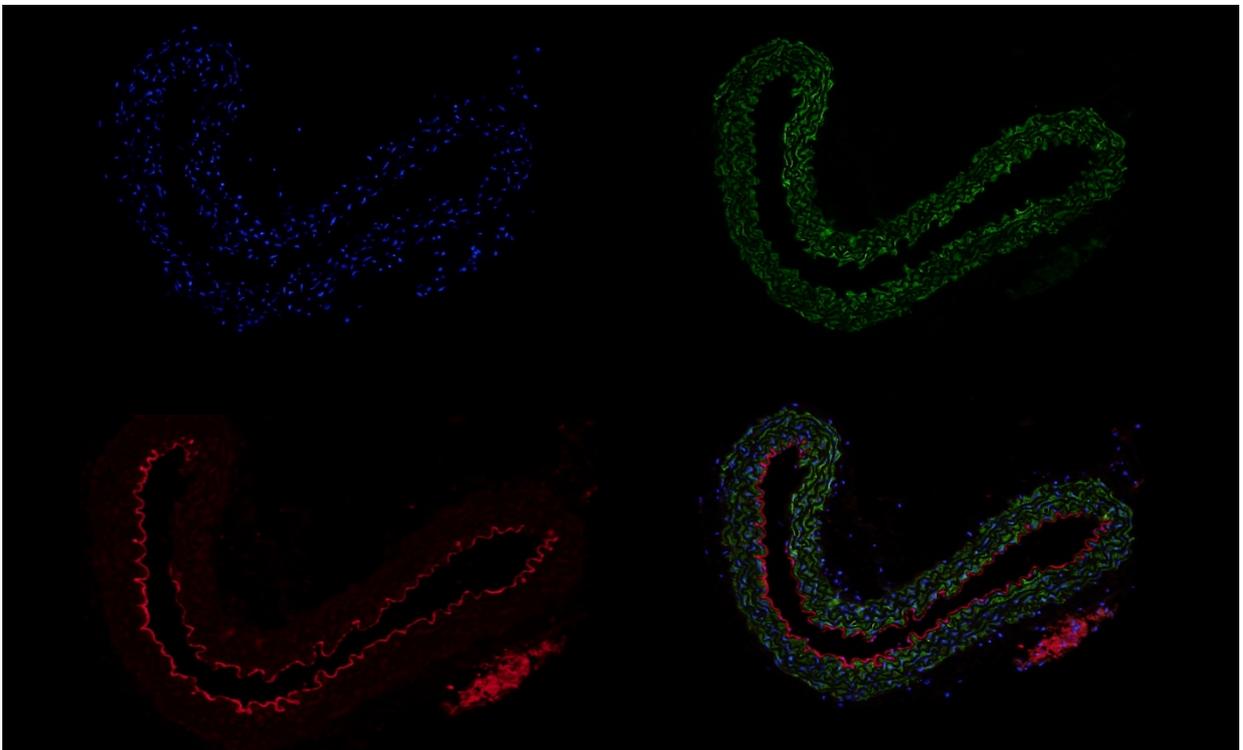


Abbildung 5- Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Triplefärbung mit DAPI in Blau (links oben), SMA alpha in Grün (rechts oben), CD31 in Rot (links unten) und in Kombinationsbetrachtung (rechts unten) - Versuchsgruppe Aorta thoracalis direkte Entnahme ohne Lagerung. (AT 0/0)

3.4.2.2 *Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)*

Eine bewährte Methodik zur Visualisierung von Zellen in der Apoptose stellt die TUNEL-Färbung (Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling) dar. Es sollte insbesondere die Möglichkeit der Zellen der regulierten Apoptose dargestellt werden bzw. die Möglichkeit eines regulierten Zellzykluses, wobei von einem regelhaften Kreislauf und damit einer möglichen funktionserhaltenen Zelle ausgegangen werden könnte.

Für die Durchführung der TUNEL Färbung erfolgte gemäß der Herstellerangabe des verwendeten ApopTag (Apoptosis Detection Kit) - Fluorescein- in situ Apoptosenachweis- Kit (Sigma-Aldrich). Dafür erfolgt die Deparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe von Xylol zu Ethanol in destilliertes Wasser. Daraufhin werden die Objektträger in PBS-Puffer drei Mal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Es folgt die Inkubation der Objektträger mit Proteinase K (20ng/ml) über 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem die erneute dreimalige Waschung von jeweils 5 Minuten der Proben mit PBS-Puffer erfolgt ist, werden die Schnitte mit dem Fettstift umrandet. Es folgt gemäß Hersteller Vorgabe die Zugabe des Equilibrierungspuffers von jeweils 13µl für 5 Minuten pro Schnitt. Anschließend wird direkt der Primärantikörper TdT Enzym (Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling) für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Hierbei werden 70% Reaktionspuffer mit dem Enzym gemischt. Die Reaktion wird mit dem Stopp Puffer (68ml Aqua Dest. gemischt mit 2ml Stopp Puffer) angehalten. Es folgt die dreifache Waschung für jeweils 5 Minuten in PBS-Puffer. Der Sekundärantikörper Fluorescein- markierter Anti- Digoxigenin Antikörper wird in der Verdünnung von 56µl Blockierlösung und 59µl Antikörperlösung auf die Schnitte für 30 Minuten gegeben. Nach erfolgter Waschung in PBS-Puffer (drei Mal für jeweils 5 Minuten) werden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und zum Schluss, nach letzter dreimaliger Waschung in PBS-Puffer werden die Objektträger mit Fluoromount eingedeckt und bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

In der untenstehenden wird ein Beispiel der DAPI-Färbung gezeigt. (Abbildung 6)

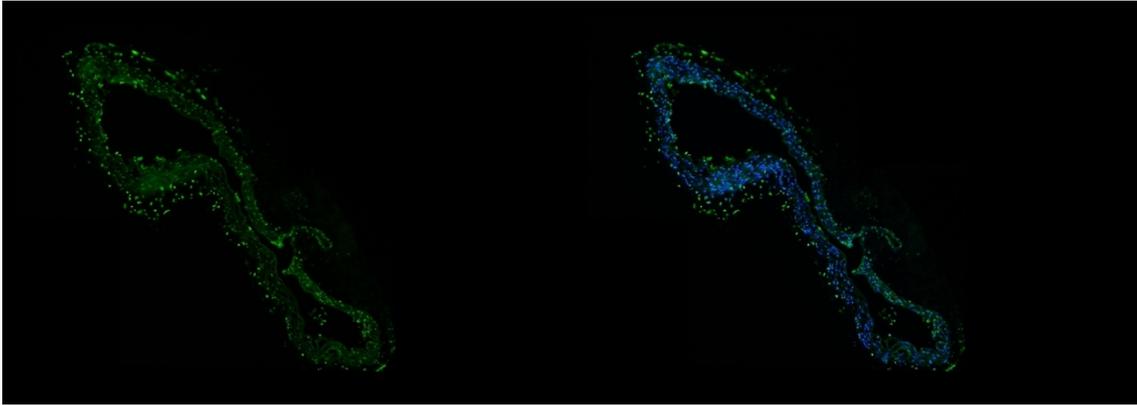


Abbildung 6- Beispieldarstellung Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta abdominalis mit verzögerter Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 36/3)

3.4.2.3 Auswertung

Die Auswertung der Immunhistologie wurde im Rahmen der regelmäßigen Laborbesprechungen zur Auswertung erarbeitet. Aufgrund der neu vorliegenden Fragestellung wurde sich auf folgende Methodik zur Auswertung der einzelnen Färbemethoden entschieden.

In allen Auswertungen wurden alle vorliegenden Schnitte desselben Präparates einer Probe ausgewertet und das entsprechende Mittel genommen. Pro Gefäßabschnittsprobe wurden vier bis sechs Anschnitte ausgewertet. Zeigten sich jedoch deutliche Schäden, welche am ehesten im Rahmen der Präparation entstanden bzw. nicht mehr vorhandene Proben wurde diese nicht in die Auswertung mit einbezogen. Nur vollständig vorhandene Anschnitte wurden gewertet.

Die Auswertungen der Bilder unter Zuhilfenahme des Bildauswertungsprogrammes ImageJ 1.47v des National Institutes of Health, USA (2013/2014). Die statistische Aufarbeitung wurde mit Microsoft Excel (letzte Version 16.82, 2024) durchgeführt und dargestellt.

3.4.2.3.1 Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha)

Für die Auswertung war die angefärbte Fluoreszenzintensität der glatten Muskulatur entscheidend, da von einer intensiven Anfärbung bei gut vorhandener Muskulatur ausgegangen werden kann. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels quantitativer Messung der Fluoreszenzintensität pro gemessene Fläche. Hierbei wurde die muskuläre Schicht händisch angezeichnet.

3.4.2.3.2 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Dasselbe Vorgehen der Auswertung wurde für die DAPI-Färbung vorgenommen. Unter der Annahme, dass eine zunehmende Degeneration des Zellkernes zu einer Verminderung der Fluoreszenz Intensität führen würde, erfolgte ebenfalls die Auswertung der Fluoreszenzintensität pro Fläche.

3.4.2.3.3 Cluster of Differentiation 31 (CD31)

Die Auswertung der Abdeckung des Gefäßes mit Endothel wurde die prozentuale Abdeckung des Gefäßes mit an der Media anliegendem Endothel vermessen. Hierfür erfolgte die händische Ausmessung des gesamten Innenumfanges des Gefäßes und des an der Gefäßwand adhärenen Endothels.

3.4.2.3.4 Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

Die Auswertung von jeweils zwei Schnitten pro Präparat wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop (BZ-V800, Firma Keyence) durchgeführt. Die Anzahl der TUNEL positiven, hellgrünen Zellen, wurden zum Ausschluss von falsch positiven Proben, mittels DAPI positiven Zellkernen korreliert.

Hierbei wurden analog zur Auswertung der Hämatoxylin- Eosin Färbung Gruppen gebildet, wobei 1-9 positive Zellen pro Präparat als gering, 10-49 positive Zellen als mittel und mehr als 50 positiven Zellen mit reichlich gewertet wurden. (Tabelle 6- Auswertungstabelle TUNEL positiver Zellen)

Tabelle 6- Auswertungstabelle TUNEL positiver Zellen

TUNEL pos. Zellen	Anzahl der TUNEL positiven Zellen pro Gefäßpräparat
Keine	0
gering	1-9
Mittel	10-49
reichlich	Mehr als 50

4 Ergebnisse

Eine Betreuung zur Auswertung der erhobenen Ergebnisse fand durch die Statistische Beratung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf statt. Die ausgesprochene Empfehlung beinhaltete die Auswertung der vorliegenden Daten mit Angaben von Standardabweichungen, da es sich innerhalb der Gruppen bzw. des Experimentes um eine zu kleine Anzahl Tiere mit vielen Variablen zur gesicherten Statistischen Auswertung handelte.

4.1 Mikrobiologie

4.1.1 Quantitative Analyse

Die Auswertung der quantitativ erhobenen Daten entspricht der Anzahl der Kolonien auf den verwendeten Agarplatten pro Versuchsgruppe. Dafür wurden die Anzahl der Kolonien Bildenden Einheiten (KBE) aller Proben pro Gruppe ausgewertet und die Agarplatten für diese Gruppe zusammengefasst.

Die Anzahl der KBE in der Intensität (vereinzelt, mittel, reichlich) wurde graphisch dargestellt, dies jedoch über die gesamte Versuchsgruppe kumuliert. Daraus ergibt sich, dass die Anzahl der KBE nicht mit der Anzahl der Proben einhergeht.

Gleichzeitig erfolgte die Auswertung der Intensität der Besiedelung des einzelnen Tieres pro Versuchsgruppe, sodass dies mit der Anzahl der Tiere in der Versuchsgruppe einhergeht.

4.1.1.1 Thorakale Aorta

In der quantitativen Auswertung der Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten (KBE) pro Versuchsgruppe zeigt sich in der Gruppe der direkt entnommenen Gefäße (AT 0/0) zwei Proben mit vereinzelt Wachstum, sonst konnten keine bakteriellen Besiedlungen festgestellt werden.

Wohingegen nach Kaltlagerung in TiProtec® desselben Entnahmezeitpunktes (AT 0/3) sich eine Zunahme der KBE auf sechs mit vereinzelt Wachstum, zwei mit mittlerem und einer KBE mit reichlich Wachstum nachweisen ließ. Somit ergibt sich eine numerische Zunahme der Anzahl der KBE von zwei (AT 0/0) auf kumulativ neun KBE (AT 0/3) pro Versuchsgruppe über die Dauer der Kaltlagerung. Außerdem zeigt sich ein Anstieg der Besiedlungsintensität. (Abbildung 7)

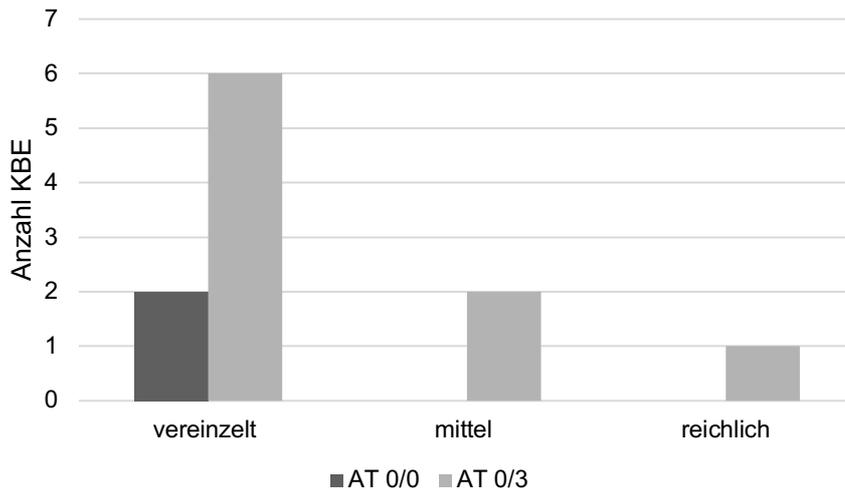


Abbildung 7- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des thorakalen Abschnittes nach direkter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AT: Aorta thoracalis)

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen nach verzögerter Entnahme der Aorta 36 Stunden postmortal ergaben sich für die Gruppe ohne Kaltlagerung (AT 36/0) vier KBE mit vereinzelter und eine KBE mit reichlichem Wachstum. In der Versuchsgruppe, welche zusätzlich noch eine Kaltlagerung der Aorta über drei Wochen erfuhr (AT 36/3), ließ sich eine Zunahme der KBE feststellen. Es zeigten sich vier KBE mit vereinzelter Wachstum, eine mit mittlerem und fünf mit reichlichem Wachstum. Kumulativ ergibt sich somit eine Zunahme von fünf KBE in der Gruppe der verzögerten Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/0) auf zehn KBE in der Gruppe nach verzögerter postmortaler Entnahme mit Kaltlagerung (AT 36/3). (Abbildung 8)

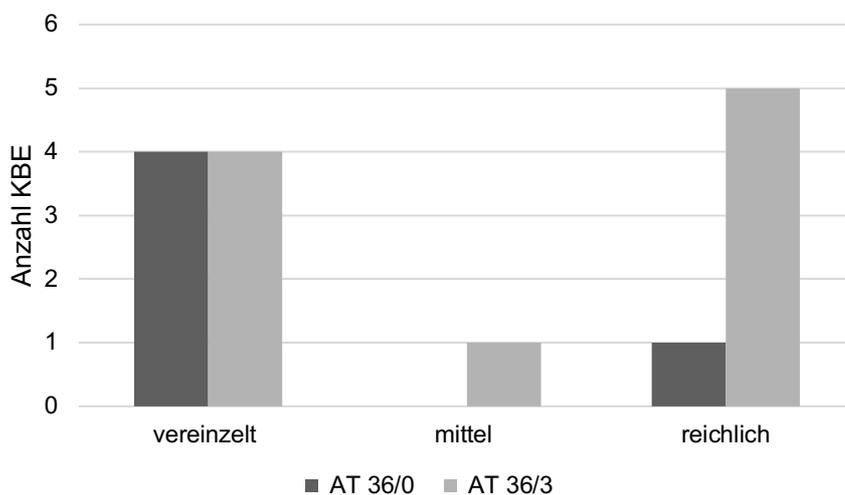


Abbildung 8- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des thorakalen Abschnittes nach verzögerter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AT: Aorta thoracalis)

Folgend wurde die maximale Anzahl an KBE pro Versuchsprobe je Gruppe ausgewertet, um eine Kontamination von einzelnen Proben herausarbeiten zu können.

In der Gruppe, der direkt entnommenen, nicht kalt gelagerten Proben (AT 0/0) ergeben sich für acht kein mikrobielles Wachstum und für zwei Proben ein Wachstum von jeweils einer KBE. Nach Kaltlagerung über drei Wochen in TiProtec® (AT 0/3) weisen vier Proben weiterhin kein mikrobielles Wachstum, vier Proben eine Besiedlung mit einer KBE und jeweils eine Probe mit zwei bzw. drei KBE auf. Es lässt sich eine Zunahme der Anzahl der KBE pro Versuchsprobe mit der Dauer der Kaltlagerung feststellen. Weiterhin zeigen nur zwei Proben eine Besiedelung mit mehr als einer KBE, nach Kaltlagerung in TiProtec® (AT 0/3). (Abbildung 9)

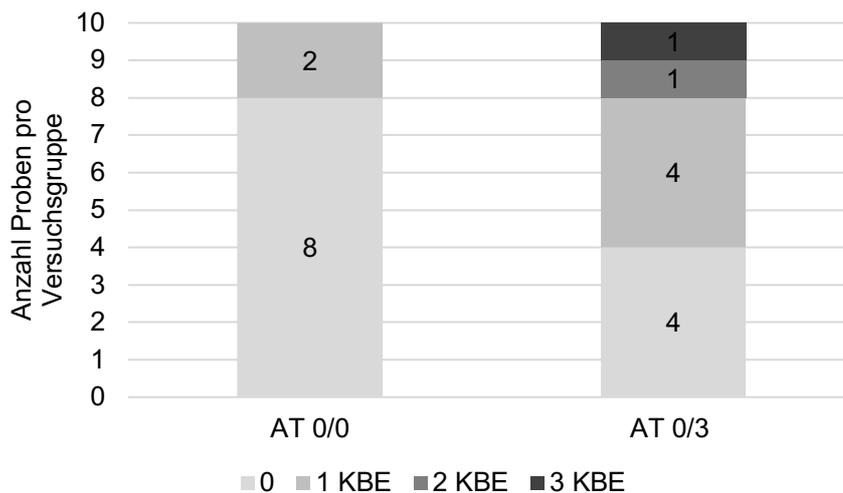


Abbildung 9- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des thorakalen Abschnittes nach direkter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AT: Aorta thoracalis)

Zusammenfassend kann nach Kaltlagerung des thorakalen Gefäßabschnittes nach direkter postmortaler Entnahme über die Lagerungsdauer eine Zunahme der KBE festgestellt werden, jedoch zeigten weiterhin nur wenige einzelne Proben eine deutliche Zunahme der Anzahl der KBE bzw. eine mehrfache Besiedlung.

In der Auswertung für die verzögerte postmortale nach 36 Stunden (AT 36/0) ergibt sich für sieben Versuchsproben kein mikrobielles Wachstum, eine Probe zeigt eine KBE auf, zwei Proben lassen zwei KBE detektieren. Nach erfolgter Kaltlagerung (AT 36/3) in der Versuchslösung TiProtec® weisen fünf Proben kein mikrobielles Wachstum auf, eine lässt eine Besiedlung mit einer KBE erkennen, drei Proben haben zwei KBE und eine Probe zeigt drei KBE. (Abbildung 10)

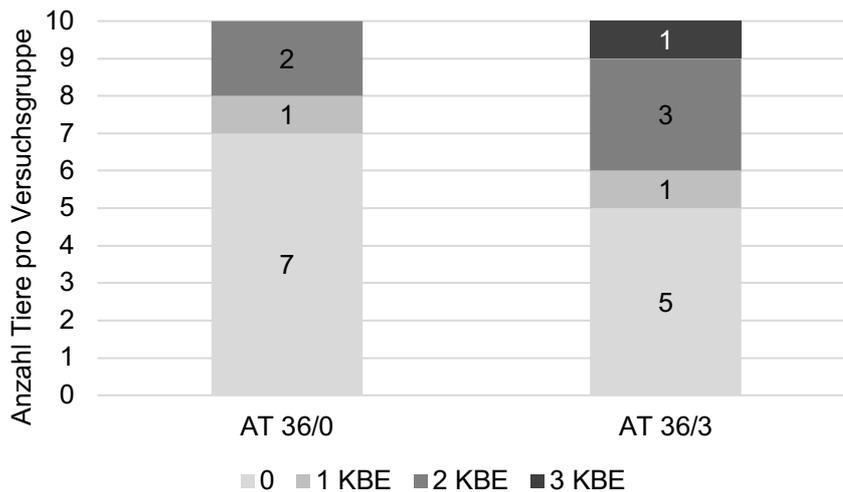


Abbildung 10- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des thorakalen Abschnittes nach direkter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AT: Aorta thoracalis)

In Zusammenschau der oben beschriebenen Ergebnisse zeigt sich somit eine Zunahme der quantitativen Anzahl an KBE über die Dauer der Kaltlagerung, auch nach vorgängig verzögerter Entnahme der Gefäßabschnitte.

Kongruent ergibt sich für beide Gruppen eine Zunahme der Besiedlung der Anzahl der Proben über die Kaltlagerung, ebenfalls zeigt sich eine Zunahme der Mehrfach-Besiedlung mit mehr als nur einer Bakterienentität.

4.1.1.2 Abdominale Aorta

Für den abdominalen Aortenabschnitt erfolgten dieselbe Auswertungsschritte wie bereits für den thorakalen Abschnitt beschrieben.

In der Aufarbeitung der Gruppe nach direkter postmortaler Entnahme (AA 0/0) der Aorta zeigen sich drei Kolonien bildenden Einheiten (KBE) mit vereinzelttem Wachstum und sieben Proben ohne mikrobielles Wachstum. Mit Dauer der Kaltlagerung (AA 0/3) können neun KBE mit vereinzelttem und eine KBE mit reichlichem Wachstum festgestellt werden. (Abbildung 11)

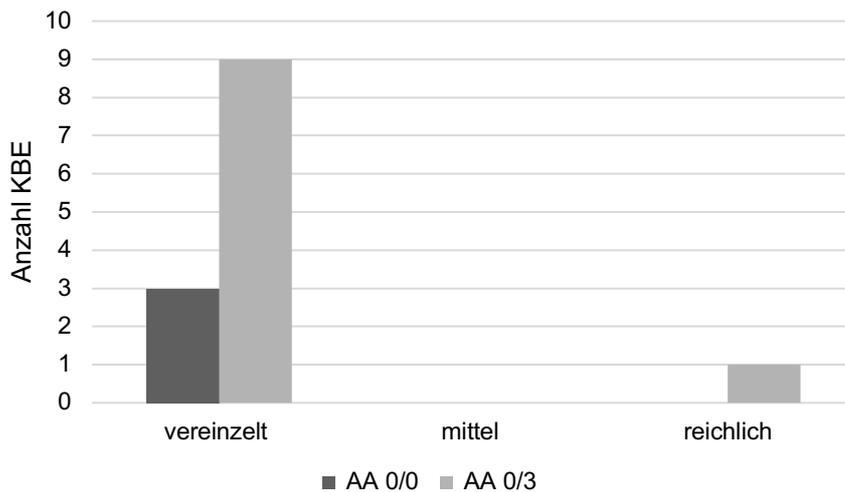


Abbildung 11- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des abdominalen Abschnittes nach direkter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AA: Aorta abdominalis)

In den Gruppen der postmortal verzögerten Entnahme der abdominalen Aorta ergeben sich in der Versuchsgruppe ohne eine Kaltlagerung (AA 36/0) fünf KBE mit vereinzelterm Wachstum, und jeweils eine Probe mit einem mittlerem bzw. reichlichem Wachstum. Über die Kaltlagerungsdauer (AA 36/3) zeigt sich das Bild von drei KBE mit vereinzelterm Wachstum, keine KBE mit einem mittlerem, jedoch sechs KBE mit reichlichem Wachstum. (Abbildung 12)

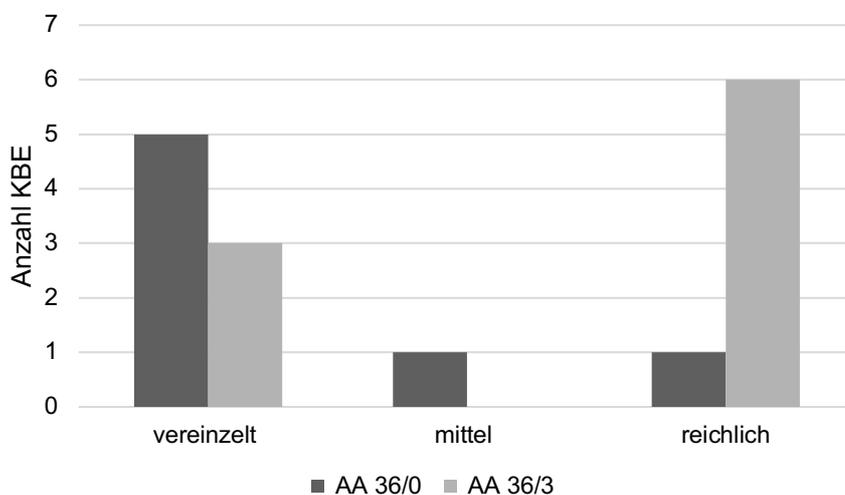


Abbildung 12- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des abdominalen Abschnittes nach verzögerter Entnahme (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AA: Aorta abdominalis)

In der Auswertung der Besiedlungsintensität pro Probe je Versuchsgruppe lassen sich bei direkter Entnahme und ohne anschließende Kaltlagerung (AA 0/0) sieben Proben ohne ein mikrobielles Wachstum vorfinden, drei Proben zeigen eine Besiedelung mit einer KBE. Über die Zeit der Kaltlagerung lässt sich eine Zunahme der KBE feststellen. In der Versuchsgruppe mit direkter Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 0/3)

lassen vier Proben kein mikrobielles Wachstum nachweisen, vier Proben zeigten eine KBE und auf zwei Proben konnten drei KBE festgestellt werden. (Abbildung 13)

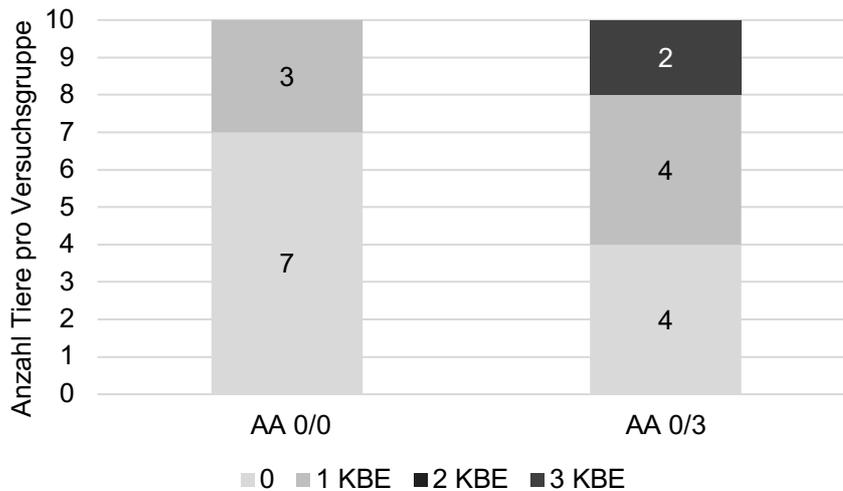


Abbildung 13- Quantitative Anzahl an KBE pro Versuchsgruppe des thorakalen Abschnittes nach direkter Entnahme- Anzahl der maximalen KBE pro Versuchstier (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AA: Aorta abdominalis)

Für die Gruppe nach verzögerter postmortaler Entnahme ohne folgende Kaltlagerung (AA 36/0) ergibt sich in sieben Proben kein mikrobielles Wachstum. Die verbleibenden drei Proben zeigen in einem Fall eine KBE und in zwei Proben drei KBE auf. Nach erfolgter Kaltlagerung (AA 36/3) ergeben sich noch drei Proben ohne nachweisbare KBE, bei fünf Proben lassen sich jeweils eine KBE feststellen, und in zwei Proben können zwei KBE festgestellt werden. Hier zeigt keine Probe mehr als zwei KBE. (Abbildung 14)

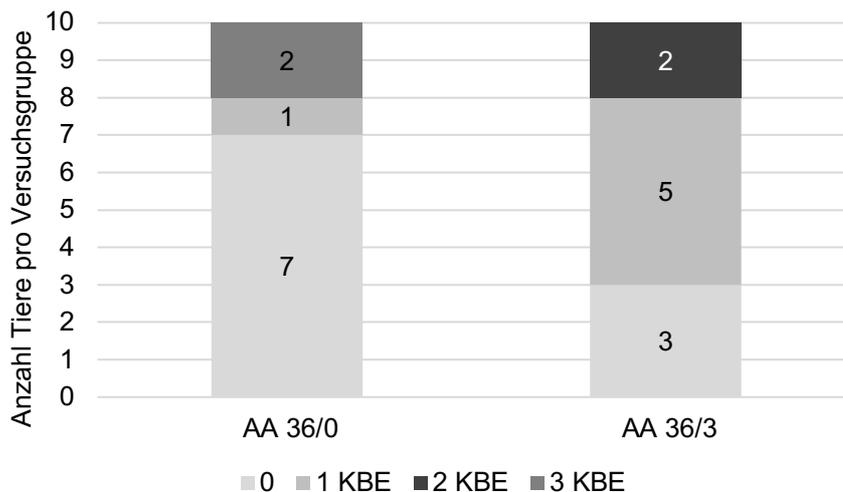


Abbildung 14- Anzahl der maximalen Kolonien bildenden Einheiten (KBE) pro Versuchstier (insg. 10) für den abdominalen Aortenabschnitt verzögerte postmortale Entnahme und keine bzw. 3 Wochen Kaltlagerung (KBE: Kolonien bildende Einheiten; AA: Aorta abdominalis)

Ebenfalls lässt sich kongruent zu der Gruppe der direkten postmortalen Entnahme eine Zunahme der Besiedlungsanzahl über die Dauer der Kaltlagerung feststellen. In Zusammenschau mit den bereits oben beschriebenen Ergebnissen zeigt sich für den abdominalen Aortenabschnitt eine Zunahme der quantitativen Intensität der KBE über die Lagerungszeit. Eine Zunahme der Besiedlungsintensität lässt sich hingegen nicht in dieser Deutlichkeit abgrenzen.

Wie bereits für den thorakalen Abschnitt festgestellt, kann auch im abdominellen Abschnitt keine Besiedlung mit mehr als 3 Kolonien Bildenden Einheiten pro Versuchsprobe festgestellt werden, auch nicht nach erfolgter Kaltlagerung in TiProtec®.

4.1.2 Qualitative Auswertung

In der weiteren massenspektrometrischen Untersuchung konnten die Bakterienspecies bestimmt werden, welche für die beiden unterschiedlichen Aortenabschnitte ausgewertet wurden. (Tabelle 7- Gesamtübersicht Bakterienspecies mit prozentualem Anteil an allen Kolonien bildenden Einheiten) Anschließend erfolgte die Auswertung pro Gruppe in Bezug auf die Gram-Färbung, Sauerstofftoleranz, Morphologie und des Besiedlungsraumes. (34,35)

In dieser Analyse zeigten sich primär intestinal besiedelnde Bakterien und bekannte Haut bzw. Schleimhautbakterien. Hierbei zeigten sich zumeist fakultativ pathogene Bakterienspecies, insbesondere Bakterienstämme der Magen-Darm-Flora können dazu gezählt werden. Aber auch die selektierte Schleimhaut und Hautflora kann in den meisten Fällen zugerechnet werden.

In der Gesamtauswertung ließen sich kumulativ 55 Kolonien bildende Einheiten (KBE) in allen ausgewerteten Gruppen und Proben feststellen. In den differenzierten Bakterienspecies ist am häufigsten ein *Enterococcus faecalis* auszumachen, welcher einen prozentualen Gesamtanteil von 25 Prozent hat. Direkt hiernach findet sich ein ebenfalls in der Darmflora bekannter *Lactobacillus johnsonii* mit 15 Prozent, gefolgt von Koagulase negativen Staphylokokken mit einem prozentualen Anteil von 9 Prozent. Die weiter aufgeführten Bakterienspecies befinden sich unter einem prozentualen Anteil von 10 Prozent. (Tabelle 7- Gesamtübersicht Bakterienspecies mit prozentualem Anteil an allen Kolonien bildenden Einheiten)

Tabelle 7- Gesamtübersicht Bakterienspecies mit prozentualem Anteil an allen Kolonien bildenden Einheiten

Bakterienspecies	Anzahl KBE	Prozentualer Anteil	Gram-Färbung	Sauerstoff-toleranz	Morphologie	Besiedlungs-gebiet
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	25%	+	aerob/ anaerob	Kokken	Dickdarm
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	8	15%	+	Fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
Koagulase negative Staphylokokken	5	9%	+	aerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
<i>Micrococcus luteus</i>	4	7%	+	aerob	Kokken	Hautflora/ Luft
<i>Bifidobacterium animalis</i>	3	5%	+	anaerob	Stäbchen	Dickdarm
<i>Lactobacillus murinus</i>	3	5%	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Lactobacillus</i> spp.	3	5%	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Parabacterioides goldsteinii</i>	3	5%	-	anaerob	Stäbchen	Darm
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	4%	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	4%	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
<i>Bacillus</i> spp.	1	2%	+	aerob	Stäbchen	Dickdarm
<i>Escherichia coli</i>	1	2%	-	fakultativ anaerob	Stäbchen	Dickdarm
<i>Lactobacillus grasseri</i>	1	2%	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1	2%	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Moraxella</i> spp.	1	2%	-	aerob	Kokken	Hautflora
<i>Paenibacillus</i> spp.	1	2%	+	fakultativ anaerob	Stäbchen, Sporenbildner	Magen- Darm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	2%	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
vergrünende Streptokokken	1	2%	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
Gesamtanzahl KBE	55	100%				

Es erfolgte die detaillierte Auswertung der Versuchsgruppen nach Entnahmezeitpunkt, Lagerungsdauer und anatomischem Abschnitt.

4.1.2.1 Thorakale Aorta

In der Ausarbeitung nach direkter Entnahme ohne weitere Kaltlagerung (AT 0/0) wurde zwei Haut- bzw. Schleimhautbakterien mit vereinzelt Wachstum nachweisen. Sowohl *Staphylococcus hominis* wie auch Koagulase negative Staphylokokken sind gram-positive Kokken, welche aerob bzw. fakultativ anaerob sind. In der Gruppe der verzögerten Entnahme (AT 36/0), ebenfalls ohne weitere Kaltlagerung, können ebenfalls Koagulase negative Staphylokokken festgestellt werden. Es lassen sich weiter Lactobacillen und Parabacteroides feststellen. Weiterhin ist die Anzahl der KBE zumeist mit vereinzelt Wachstum nachzuweisen, nur eine KBE zeigt ein reichliches Wachstum. (Tabelle 8- Bakterienspecies mit Merkmalen für den thorakalen Aortenabschnitt, keine Kaltlagerung) Somit ergibt sich bei direkter Entnahme und ohne Kaltlagerung singuläre Hautbesiedler, wohingegen nach verzögerter Entnahme noch Bakterienspecies des Gastrointestinaltraktes hinzukommen, jedoch in geringer Anzahl.

Tabelle 8- Bakterienspecies mit Merkmalen für den thorakalen Aortenabschnitt, keine Kaltlagerung

Keine Kaltlagerung	Anzahl der Proben mit Kolonien bildenden Einheiten (KBE)							
	Bakterium	vereinzelt	mittel	reichlich	Gram-Färbung	Sauerstoff-toleranz	Morphologie	Besiedlungsraum
Gruppe AT 0/0								
Koagulase negative Staphylokokken	1	0	0	+	aerob	Kokken	Haut/Schleimhaut	
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0	0	+	Fakultativ anaerob	Kokken	Haut/Schleimhaut	
Gruppe AT 36/0								
Koagulase negative Staphylokokken	1	0	0	+	aerob	Kokken	Haut/Schleimhaut	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1	0	0	+	Fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen-Darm	
<i>Lactobacillus murinus</i>	1	0	0	+	Fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen-Darm	
<i>Parabacterioides goldsteinii</i>	1	0	1	-	anaerob	Stäbchen	Darm	

Die Bakterientitäten und die Besiedlungsintensität ändert sich über die Dauer der Kaltlagerung in der Versuchslösung TiProtec®. In der Gruppe nach direkter Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3) lässt sich eine KBE mit vereinzelt Wachstum von vergrünenden Streptokokken feststellen, somit klassische Haut bzw. Schleimhautbesiedler. Die weiteren Bakterientitäten sind zumeist dem Gastrointestinalen Trakt zuzuschreiben. Es finden sich fünf KBE mit vereinzelt Wachstum, welche den Lactobacillen zuzuschreiben sind. Eine mittlere Besiedlungsintensität zeigt das Bifidobacterium, eine KBE mit reichlichem Wachstum lässt sich dem *Enterococcus faecalis* zuordnen. Auffallend über die Kaltlagerungsdauer

sind die Entitäten zumeist fakultativ oder strikt anaerob. Zumeist handelt es sich um fakultativ pathogene Bakterien. Die gesamte Gruppe zeigt ein gram- positives Färbeverhalten.

Nach verzögerter Entnahme und durchgeführter Kaltlagerung (AT 36/3) ergibt sich ein vergleichbares Bild zur direkten Entnahme und folgender Kaltlagerung. In der Gruppe (AT 36/3) zeigen sich fünf KBE mit reichlichem Wachstum, welche Koagulase negative Streptokokken und Enterococcus faecalis darstellen. Es zeigen sich Lactobacillen mit einer KBE mit vereinzelt Wachstum, zusätzlich können der Haut- bzw. Schleimhautflora zurechenbaren Bakterienentitäten des Micrococcus luteus und der Moraxella spp. mit vereinzelter bzw. mittlerer Besiedlung festgestellt werden. Es ergibt sich ebenfalls eine Kombination aus gastrointestinaler mit cutaner Bakterienentitäten. Bis auf eine Species der Moraxella spp. ergibt sich ebenfalls ein Gram- positives Färbeverhalten. (Tabelle 9- Bakterien species mit Merkmalen für den thorakalen Aortenabschnitt, mit Kaltlagerung)

Tabelle 9- Bakterien species mit Merkmalen für den thorakalen Aortenabschnitt, mit Kaltlagerung

3 Wochen Kaltlagerung in TiProtec®	Anzahl der Proben mit Kolonien bildenden Einheiten (KBE)						
	vereinzelt	mittel	reichlich	Gram-Färbung	Sauerstoff-toleranz	Morphologie	Besiedlungsraum
Gruppe AT 0/3							
Bifidobacterium animalis	0	1	0	+	anaerob	Stäbchen	Dickdarm
Enterococcus faecalis	0	0	1	+	aerob/ anaerob	Kokken	Dickdarm
Lactobacillus johnsonii	4	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
Lactobacillus reuteri	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
Lactobacillus spp.	0	1	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
vergrünende Streptokokken	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
Gruppe AT 36/3							
Enterococcus faecalis	1	0	3	+	aerob/ anaerob	Kokken	Dickdarm
Koagulase negative Staphylokokken	0	0	2	+	aerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
Lactobacillus murinus	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
Micrococcus luteus	2	0	0	+	aerob	Kokken	Hautflora/ Luft
Moraxella spp.	0	1	0	-	aerob	Kokken	Hautflora

4.1.2.2 Abdominale Aorta

In den beiden Gruppen ohne eine weitere Kaltlagerung zeigt sich nach direkter postmortaler Entnahme (AA 0/0) zweimalig eine vereinzelte Besiedlung mit Hautkeimen, mit *Micrococcus luteus* und *Staphylococcus capitis*.

Nach verzögerter postmortaler Entnahme ohne Kaltlagerung (AA 36/0) ergibt sich ebenfalls ein Mischbild aus Haut bzw. Schleimhaut und gastrointestinaler Flora. Es zeigt sich eine KBE mit reichlicher Besiedlung mit *Lactobacillus murinus*, einem fakultativ anaeroben intestinalen Bakterium und eine KBE mit mittlerer Besiedlungsintensität mit *Parabacterioides goldsteinii*, welches der intestinalen Flora zuzuordnen ist. Die weiteren fünf KBE verteilen sich auf die angesprochene cutane, gastrointestinale Mischflora. Bis auf die Koagulase negativen Streptokokken weisen die weiteren Bakterienarten ein fakultativ anaerobes bzw. anaerobes Wachstum auf, welches mit einem gemischten gram Färbeverhalten einhergeht. (Tabelle 10- Bakterienarten mit Merkmalen für den abdominalen Aortenabschnitt, keine Kaltlagerung)

Tabelle 10- Bakterienarten mit Merkmalen für den abdominalen Aortenabschnitt, keine Kaltlagerung

Keine Kaltlagerung	Anzahl der Proben mit Kolonien bildenden Einheiten (KBE)							
	Bakterium	vereinzelte	mittel	reichlich	Gram-Färbung	Sauerstofftoleranz	Morphologie	Besiedlungsräum
Gruppe AA 0/0								
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0	0	+	aerob	Kokken	Hautflora/ Luft	
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	0	0	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut	
Gruppe AA 36/0								
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0	0	+	aerob/ anaerob	Kokken	Dickdarm	
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	-	fakultativ anaerob	Stäbchen	Dickdarm	
Koagulase negative Streptokokken	1	0	0	+	aerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut	
<i>Lactobacillus murinus</i>	0	0	1	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm	
<i>Lactobacillus spp.</i>	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm	
<i>Parabacterioides goldsteinii</i>	0	1	0	-	anaerob	Stäbchen	Darm	

Über den Verlauf von drei Wochen der Kaltlagerung in der Versuchslösung TiProtect® zeigt sich für den abdominalen Abschnitt erneut eine Mischflora. Hierbei konnten in der Gruppe der direkten Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AA 0/3) eine KBE mit reichlichem Wachstum als *Enterococcus faecalis* identifiziert werden. Weiter zeigen sich

neun KBE mit vereinzelt Wachstum aus dem Bereich der cutanen und intestinalen Bakterienflora. Es zeigte sich eine KBE mit *Mirococcus luteus*, welche eine aerobe Umgebung präferiert, die restlichen Species sind anaerob bzw. fakultativ anaerob. Alle in dieser Gruppe festgestellten Species zeigen ein positives Gram Färbeverhalten.

In der Versuchsgruppe der verzögerten postmortalen Entnahme und gefolger Kaltlagerung (AA 36/3) über drei Wochen zeigten sich fünf KBE mit *Enterococcus faecalis* mit reichlichem Wachstum, sowie eine KBE mit *Lacotacillus johnsonii* ebenfalls mit reichlichem Wachstum. Die verbleibenden drei KBE mit vereinzelt Wachstum sind erneut der gastrointestinalen und cutanen Mischflora zuzuordnen. (Tabelle 11- Bakterien-species mit Merkmalen für den abdominalen Aortenabschnitt, mit Kaltlagerung)

Tabelle 11- Bakterien-species mit Merkmalen für den abdominalen Aortenabschnitt, mit Kaltlagerung

3 Wochen Kaltlagerung in TiProtec®	Anzahl der Proben mit Kolonien bildenden Einheiten (KBE)						
	vereinzelt	mittel	reichlich	Gram-Färbung	Sauerstoff-toleranz	Morphologie	Besiedlungsraum
Gruppe AA 0/3							
<i>Bifidobacterium animalis</i>	2	0	0	+	anaerob	Stäbchen	Dickdarm
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	1	+	aerob/anaerob	Kokken	Dickdarm
<i>Lactobacillus grasseri</i>	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0	0	+	aerob	Kokken	Hautflora/ Luft
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0	00	+	fakultativ anaerob	Kokken	Haut/ Schleimhaut
Gruppe AA 36/3							
<i>Bacillus spp.</i>	1	0	0	+	aerob	Stäbchen	Dickdarm
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	5	+	aerob/anaerob	Kokken	Dickdarm
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0	0	1	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Lactobacillus spp.</i>	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen	Magen- Darm
<i>Paenibacillus spp.</i>	1	0	0	+	fakultativ anaerob	Stäbchen, Sporenbildner	Magen- Darm

Weder in der quantitativen noch der qualitativen Analyse ergaben sich Anhalt für einen fungale Besiedlung.

Ebenfalls konnte bei keiner Negativprobe der Versuchslösung TiProtec® ein mikrobiologisches Wachstum festgestellt werden.

4.2 Histologie/ Immunhistologie

4.2.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung (HE-Färbung)

Die Auswertung der Färbungen mit dem Auflichtmikroskop (Zeiss, Standard 24, 45VA Typ B) statt.

4.2.1.1 Aorta thoracalis

Nach Entnahme der Aorta und direkter Aufbereitung konnten in den Gruppen (AT 0/0) sowie nach 3-wöchiger Kaltlagerung (AT 0/3) keine Stromadegeneration in der HE-Färbung festgestellt werden. Dasselbe Bild zeigte sich für die Gruppe der direkten Entnahme, welche über 3 Wochen in TiProtect® kalt gelagert wurden. (Abbildung 15)

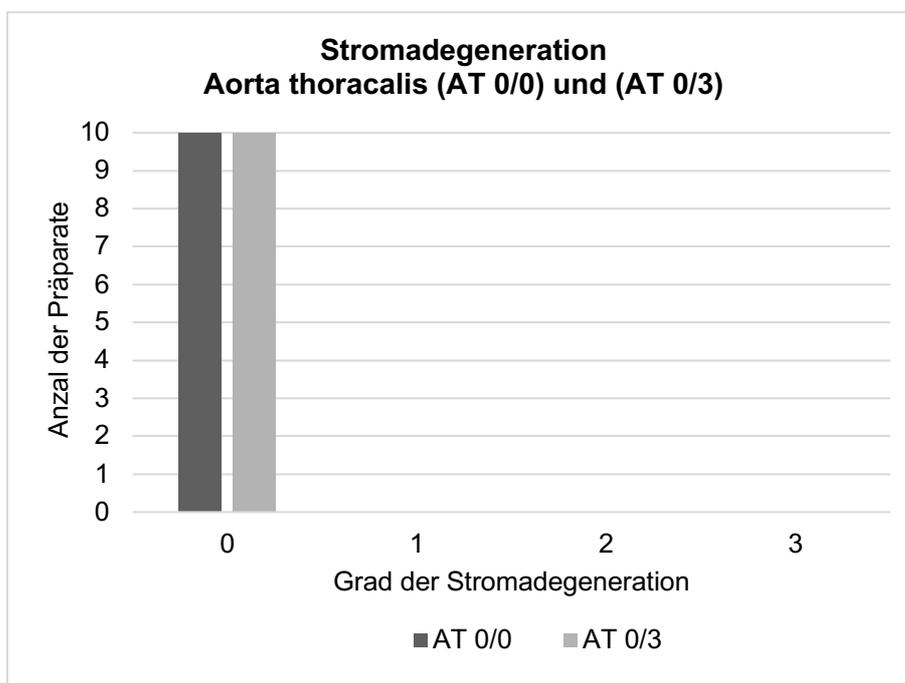


Abbildung 15- Grad der Stromadegeneration der Aorta thoracalis für die Versuchsgruppe der direkten Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

Zur Beurteilung der Autolyse zeigten die beiden Gruppen der direkten postmortalen Entnahme mit und ohne gefolgter Kaltlagerung ebenfalls keine graduelle Abblassung der Zellkerne. In beiden Gruppen zeigten alle zehn Präparate keine Abblassung.

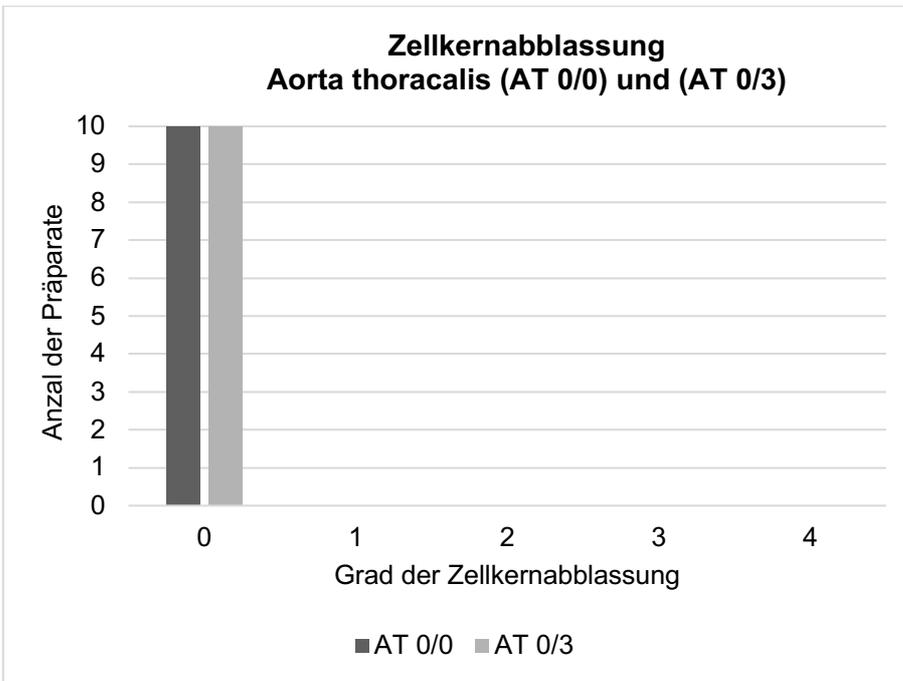


Abbildung 16- Grad der Zellkernabblassung der Aorta thoracalis für die Versuchsgruppe der direkten Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

In der Versuchsgruppe der verzögerten postmortalen Entnahme der Aorta zeigten die Gruppen mit und ohne Kaltlagerung der Aorta thoracalis jeweils eine zweitgradige Stromadegeneration.

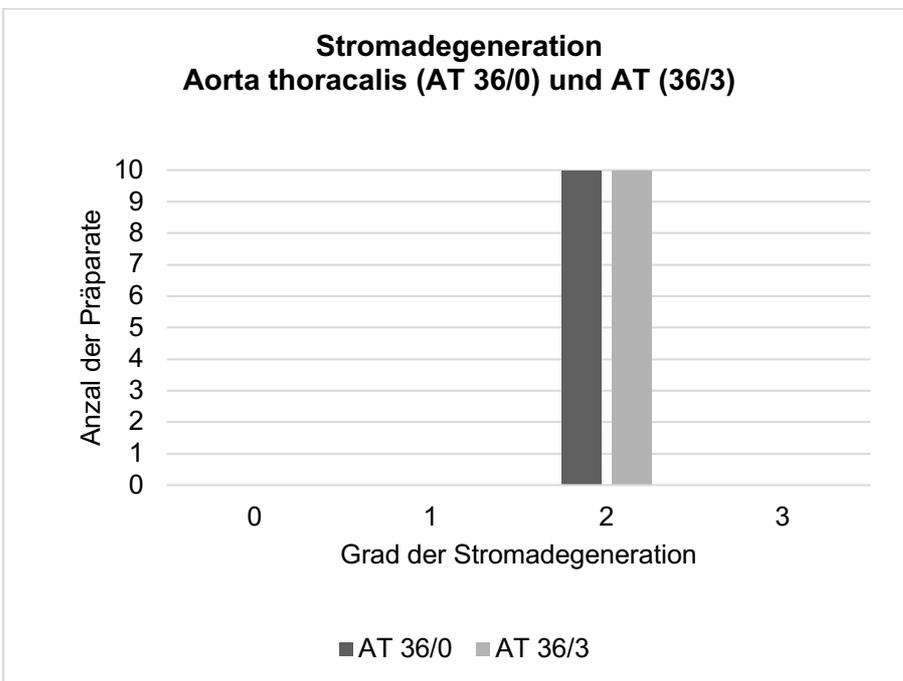


Abbildung 17 - Grad der Stromadegeneration und Zellkern Abblassung der Aorta thoracalis für die Versuchsgruppe der verzögerten postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung.

In der weiteren Auswertung der Zellkern Abblassung wiesen alle zehn Präparate den ersten Grad der Abblassung auf. Nach 3-wöchiger Kaltlagerung der Gefäße erwies ein

Präparat keine Zellkern Abblassung auf, neun Gefäße ließen sich eine Grad eins Abblassung zuordnen.

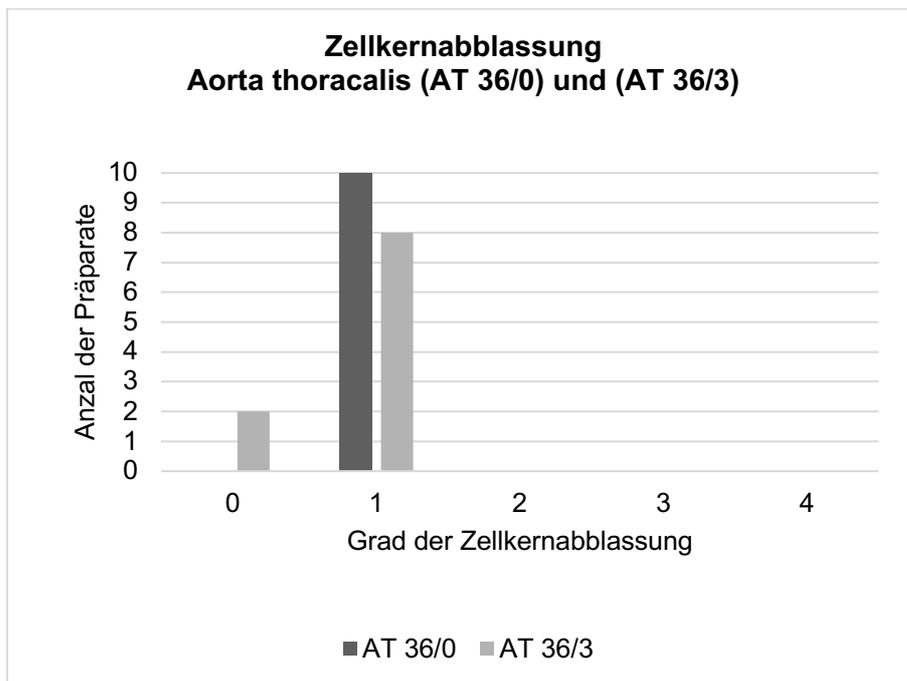


Abbildung 18- Grad der Zellkernabblassung der Aorta thoracalis für die Versuchsgruppe der verzögerten postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

4.2.1.2 Aorta abdominalis

Alle 10 Proben der Aorta abdominalis zeigten nach direkter Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung keine Stromadegeneration und keine Zellkernabblassung. Dies zeigt sich kongruent zu den Ergebnissen derselben Versuchsgruppen der Aorta thoracalis.

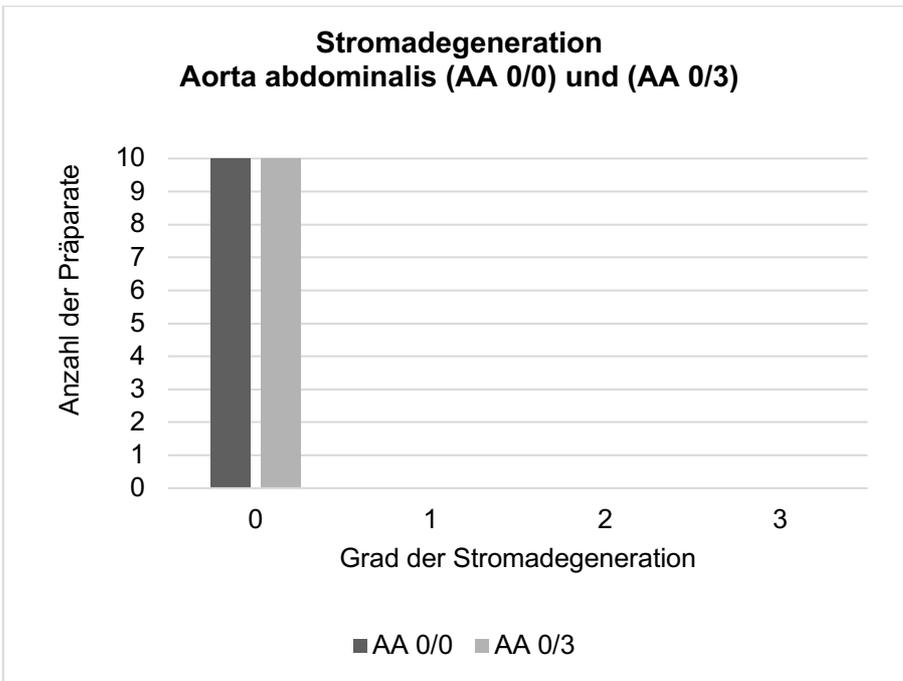


Abbildung 19- Grad der Stromadegeneration der Aorta abdominalis für die Versuchsgruppe der direkte postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

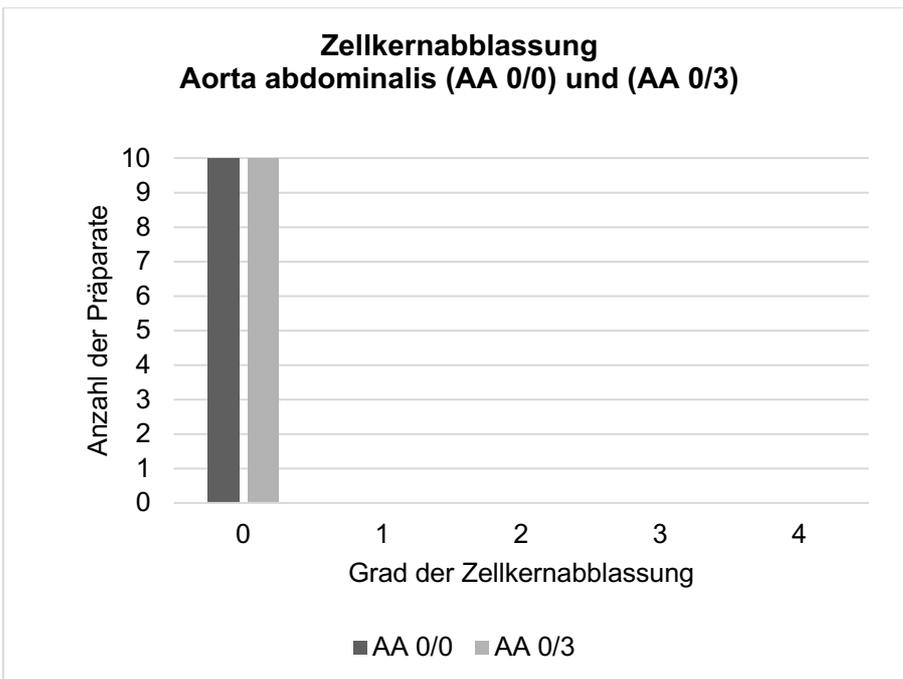


Abbildung 20- Grad der Zellkernabblassung der Aorta abdominalis für die Versuchsgruppe der direkte postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

Nach verzögerter postmortaler Entnahme der abdominalen Aorta ergibt sich ein differenzierteres Bild. Es weisen in der postmortalen Entnahme ohne Kaltlagerung (AA 36/0) ein Präparat ein Grad eins und acht Präparate ein Grad zwei Stromadegeneration auf.

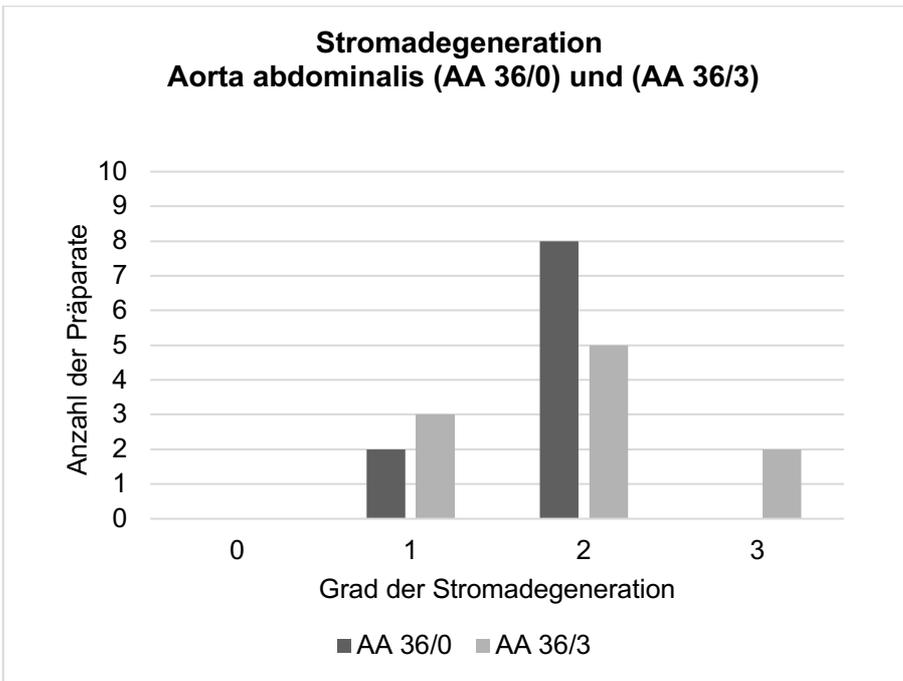


Abbildung 21- Grad der Stromadegeneration der Aorta abdominalis für die Versuchsgruppe der direkte postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

In Bezug auf die Zellkernabblassung finden sich alle zehn Präparate mit einer Grad eins Abblassung wieder. Nach verzögerter Entnahme mit weiterer Kaltlagerung (AA 36/3) wiesen drei Präparate eine Grad eins, fünf Präparate eine Grad zwei und zwei Präparate eine Grad drei Stromadegeneration auf. Zur Beurteilung der Zellkernabblassung weisen 6 Präparate keine Abblassung auf. Zwei zeigen eine Abblassung Grad eins Abblassung, jeweils ein Präparat der Gruppe zeigen eine Grad drei bzw. vier Abblassung.

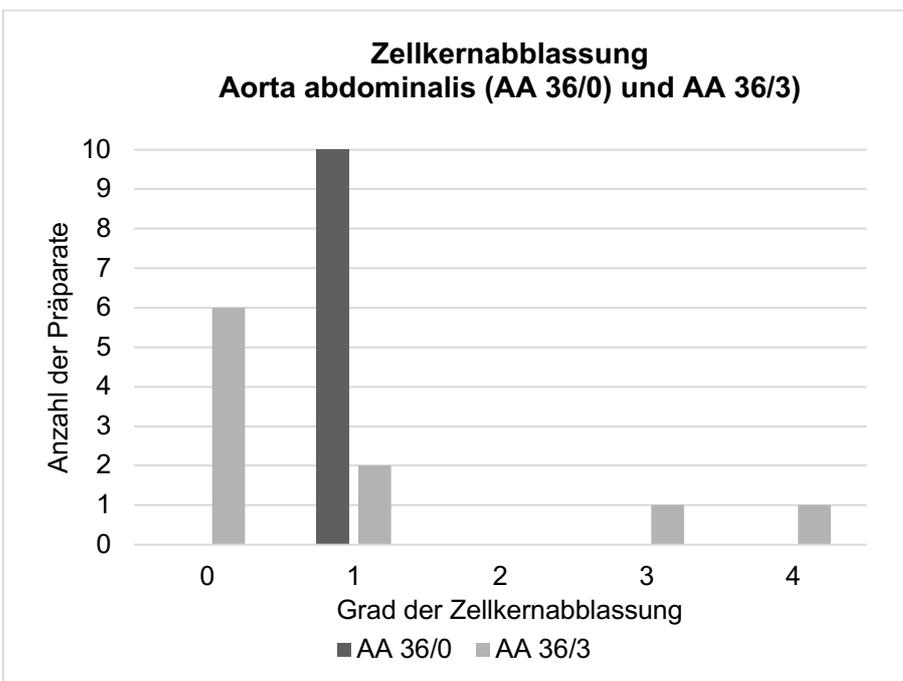


Abbildung 22- Grad der Zellkernabblassung der Aorta abdominalis für die Versuchsgruppe der direkte postmortalen Entnahme mit und ohne Kaltlagerung

4.2.2 Cluster of Differentiation 31 (CD 31)

4.2.2.1 Aorta thoracalis

In der Auswertung der Bedeckung des Gefäßpräparates mit Endothel ergibt sich für eine direkte Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0) eine prozentuale Abdeckung von 89% (+/- 8%). In der Gruppe der direkten Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3) zeigen sich 69% (+/-19%) des Gefäßes mit anliegendem Endothel.

Nach verzögerter postmortaler Entnahme (AT 36/0) ergeben sich 59% (+/- 22%) anliegendes Endothel in der Gruppe ohne Kaltlagerung. In der Gruppe nach verzögerter postmortaler Entnahme und gefolgter Kaltlagerung (AT 36/3) sind noch 10% (+/- 9.4) der Gefäßwand mit Endothel bedeckt. (Abbildung 23)

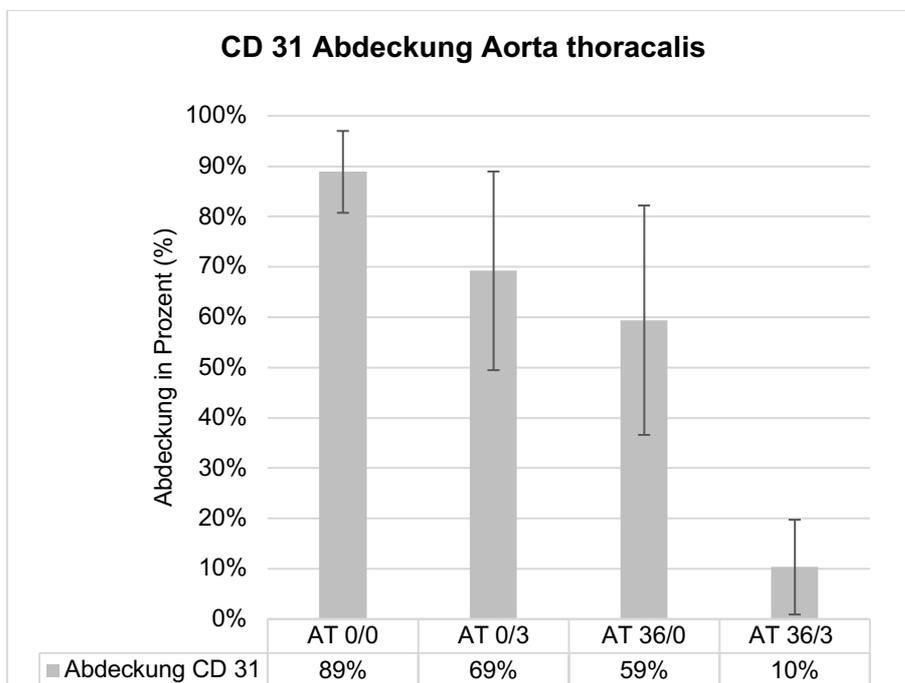


Abbildung 23- Prozentuale Bedeckung der Aorta thoracalis mit CD 31 (Intima)

Zur Darstellung der Probenverteilung innerhalb der Gruppe erfolgte die Boxplot Auswertung. Es kommen innerhalb der abgebildeten Box der Median (als Strich), der Mittelwert (als Kreuz), das untere und obere Quartil der Boxbegrenzung zur Darstellung. Die Linien zeigen die weitere Probenverteilung, bis maximal das 1,5 fache der Boxdarstellung. Darüber hinaus reichende Proben werden als Einzelmarkierungen dargestellt. Es zeigt sich eine enge Verteilungsbreite für die direkt entnommenen Gefäßabschnitte ohne folgende Kaltlagerung (AT 0/0), hierbei entspricht der Median dem Mittelwert. Die Verteilungsbreite wird deutlicher für die direkt entnommenen Proben mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3), in einem gleichen Maße zeigt sich eine grössere Verteilungsbreite für die verzögerte postmortale Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/0). In der Versuchsgruppe der postmortal verzögert entnommenen und folgend

kaltgelagerten Gefäßabschnitten ergibt sich eine geringere Verteilungsbreite, ebenfalls entspricht der Median dem Mittelwert. (Abbildung 24)

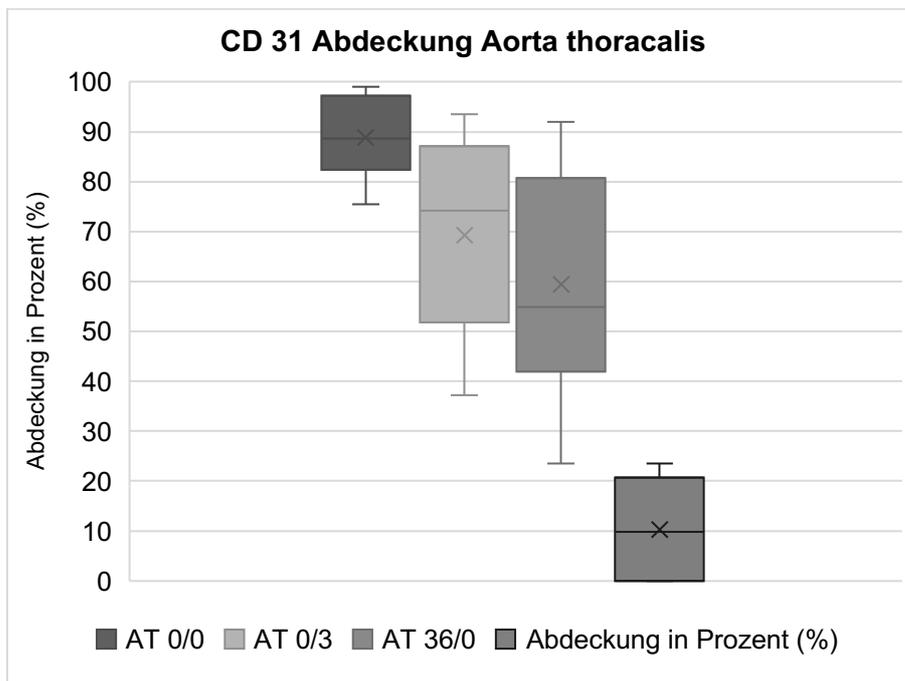


Abbildung 24- Prozentuale Bedeckung der Aorta thoracalis mit CD 31 (Intima) in Boxplot Darstellung

4.2.2.2 Aorta abdominalis

In den abdominalen Abschnitten ergibt sich eine Endothel- Bedeckung von über 80% (+/-13%) in den direkt entnommenen und nicht kalt gelagerten Präparaten (AA 0/0). Nach direkter Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 0/3) ergibt sich noch eine Bedeckung der Gefäßwand von 60% (+/- 15%). In der Gruppe der verzögert postmortal entnommenen Gefäßabschnitte (AA 36/0) zeigt sich eine deutliche Minderung der Bedeckung der Intima mit weniger als 5% (+/- 5%). Eine noch geringe Abdeckung zeigt sich nach verzögerter postmortaler Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 36/3) mit 2% (+/- 3%). (Abbildung 25)

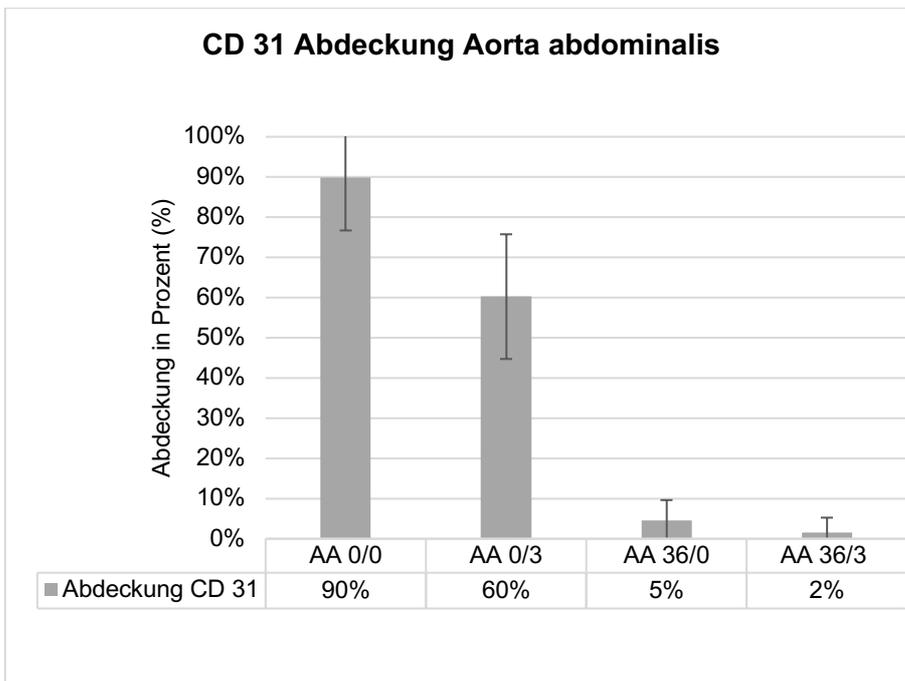


Abbildung 25- Prozentuale Bedeckung der Aorta abdominalis mit CD 31 (Intima)

Ebenfalls zeigt die Boxplot Darstellung zur besseren Aufschlüsselung der oben abgebildeten Ergebnisse. Die enge Verteilungsbreite der direkt entnommenen postmortalen Gefäße (AA 0/0) mit einer unteren Grenze des unteren Quartils bis 80%. Die Verteilungsbreite ist nach Kaltlagerung bei direkter Entnahme (AA 0/3) in einer ähnlichen Verteilungsbreite, jedoch mit deutlich mehr Streuung. Nach verzögerter postmortaler Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung zeigt sich fast keine Bedeckung der Gefäßabschnitte, mit wenig größerer Verteilung ohne (AA 36/0) gegenüber der folgender Kaltlagerung (AA 36/3). (Abbildung 26)

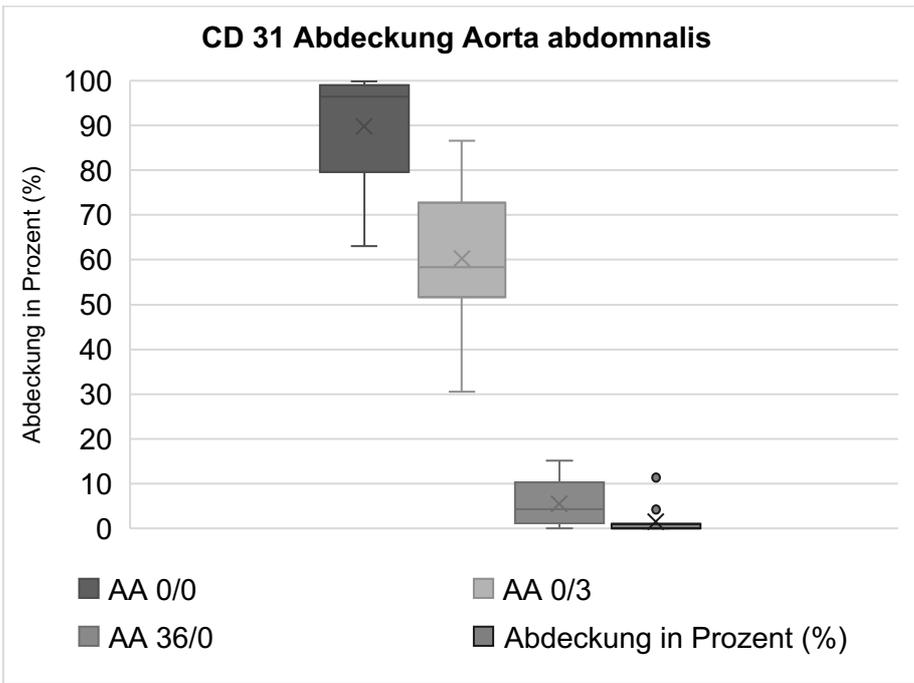


Abbildung 26- Prozentuale Bedeckung der Aorta abdominalis mit CD 31 (Intima) in Boxplot Darstellung

Nachfolgend zeigt sich folgende Abdeckung der Gefäßpräparate mit CD 31 angefärbtem Endothel in der Gegenüberstellung der thorakalen versus die abdominalen Abschnitte. Für den thorakalen Abschnitt ergibt sich kein relevanter Unterschied, jedoch nach verzögerter postmortaler Entnahme ergibt sich für den thorakalen Teil eine deutliche bessere Anlagerung an die Gefäßwand gegenüber dem abdominalen Anteil. (Abbildung 27)

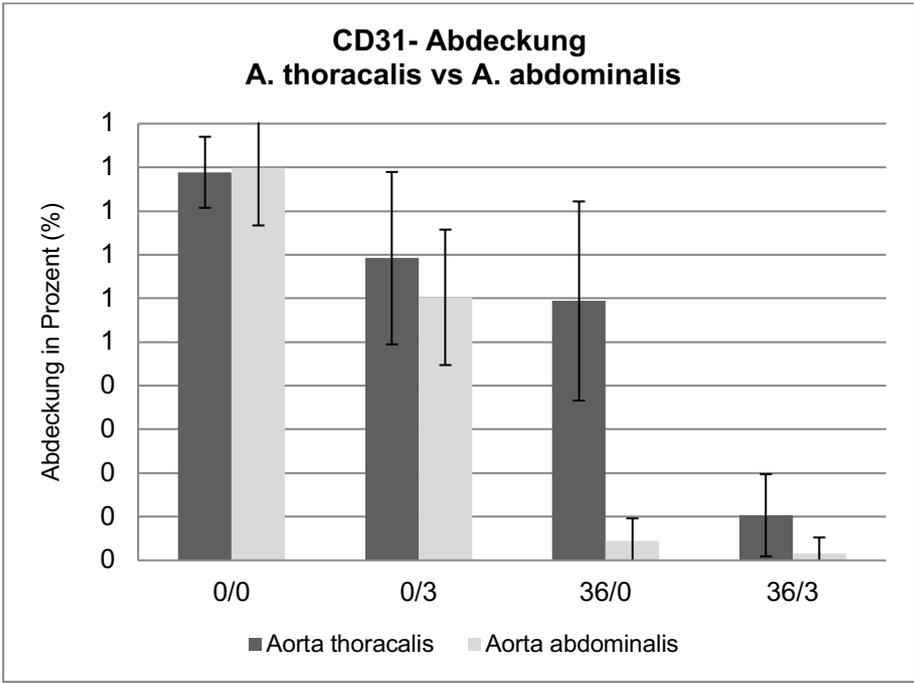


Abbildung 27- Prozentuale Bedeckung der Aorta thoracalis und Aorta abdominalis mit CD 31 (Intima) in Gegenüberstellung

4.2.3 Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha)

4.2.3.1 Aorta thoracalis

In der Auswertung der Färbung der Gefäße mit SMA alpha, welches die Intensität der Färbung der Muskelzellen repräsentiert, ergibt sich für den thorakalen Gefäßabschnitt ein recht konstantes Bild. Hierbei zeigt sich eine durchschnittliche Intensität pro Flächeneinheit der Fluoreszenzaktivität von 0,056 mit einer Standardabweichung von 0,02 für die Gruppe der direkten Entnahme und Weiterverarbeitung (AT 0/0). In der Gruppe der direkten Entnahme mit postmortaler Kaltlagerung (AT 0/3) ergibt sich ein Durchschnittswert von 0,057 mit einer Standardabweichung von 0,01. In der verzögerten postmortalen Entnahme (AT 36/0) zeigt sich ein Durchschnittswert der Fluoreszenzintensität von 0,07 mit einer Standardabweichung von 0,02, sowie für die verzögerte Entnahme mit postmortaler Kaltlagerung (AT 36/3) von 0,061 mit einer Standardabweichung von 0,01. (Abbildung 28)

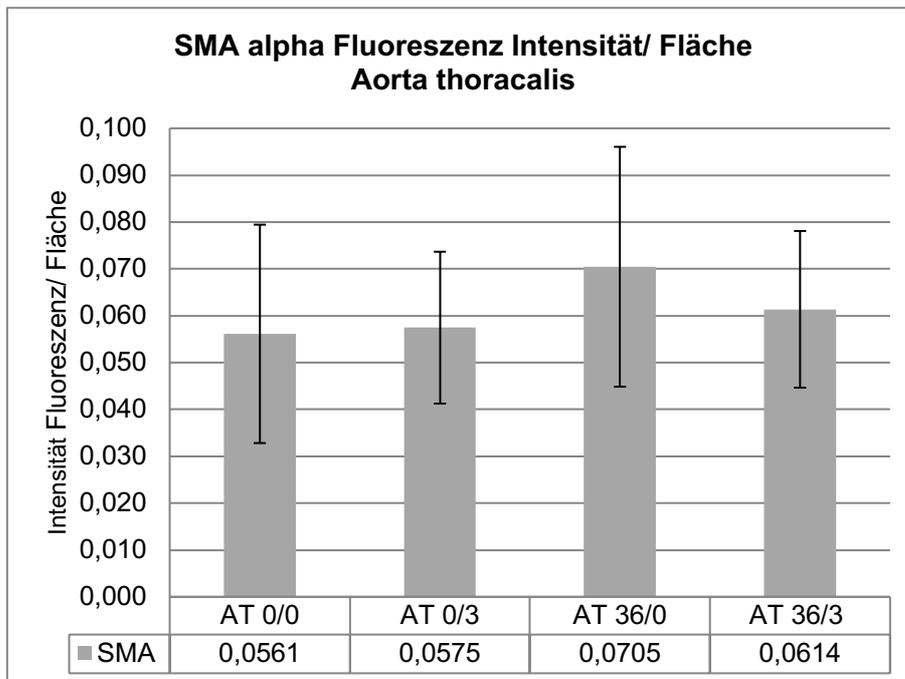


Abbildung 28 - Intensität der SMA alpha Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis

Ebenfalls erfolgte zur Übersicht die Darstellung mittels Boxplot Diagramm. Es ergibt sich für den thorakalen Aortenabschnitt eine große Verteilungsbreite für die Gruppe der direkten Entnahme und Verarbeitung (AT 0/0), und eine geringere Verteilungsbreite für die verzögert postmortale Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/0). Die Gruppen der Kaltlagerung (AT 0/3 bzw. AT 36/3) zeigen eine ähnliche Verteilung mit gleichen Mittel- bzw. Medianwerten. Lediglich in der verzögerten postmortalen Entnahme (AT 36/0) ergibt sich eine nach oben abweichende Probe, womit der erhöhte Mittelwert bei fast gleichbleibendem Median erklärt werden könnte. (Abbildung 29)

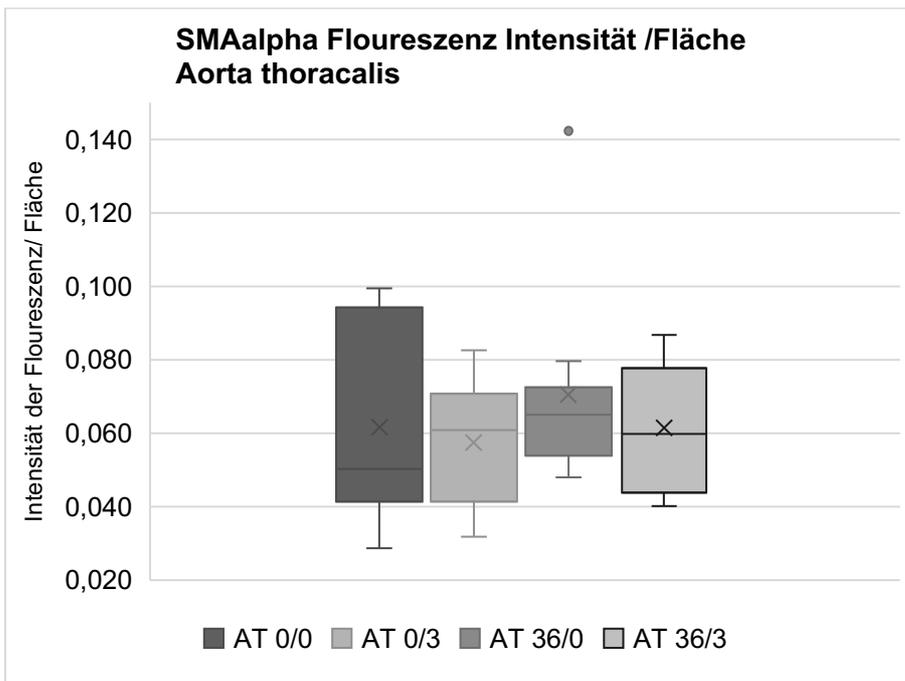


Abbildung 29- Intensität der SMA alpha Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis in Boxplot Darstellung

4.2.3.2 Aorta abdominalis

In der Auswertung der SMA alpha für den abdominalen Abschnitt zeigt sich ebenfalls die Intensität der Fluoreszenz pro Fläche eine Verteilung von 0,1 bis 0,08. In der Gruppe der direkt entnommenen Aorten ohne Kaltlagerung (AA 0/0) beträgt der Durchschnitt 0,108 (+/- 0,0418), in der Gruppe der direkten Entnahme mit Kaltlagerung (AA 0/3) beträgt der Durchschnitt 0,088 (+/- 0,039). Bei verzögert postmortal entnommenen Gefäße zeigt sich in der Gruppe ohne Kaltlagerung (AA 36/0) ein Durchschnittswert von 0,09 (+/- 0,02). Bei verzögerter postmortaler Entnahme mit Kaltlagerung (AA 36/3) ergibt sich ein Wert von 0,083 (+/- von 0,01). Es lassen sich somit keine essenziellen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität pro Fläche feststellen. (Abbildung 30)

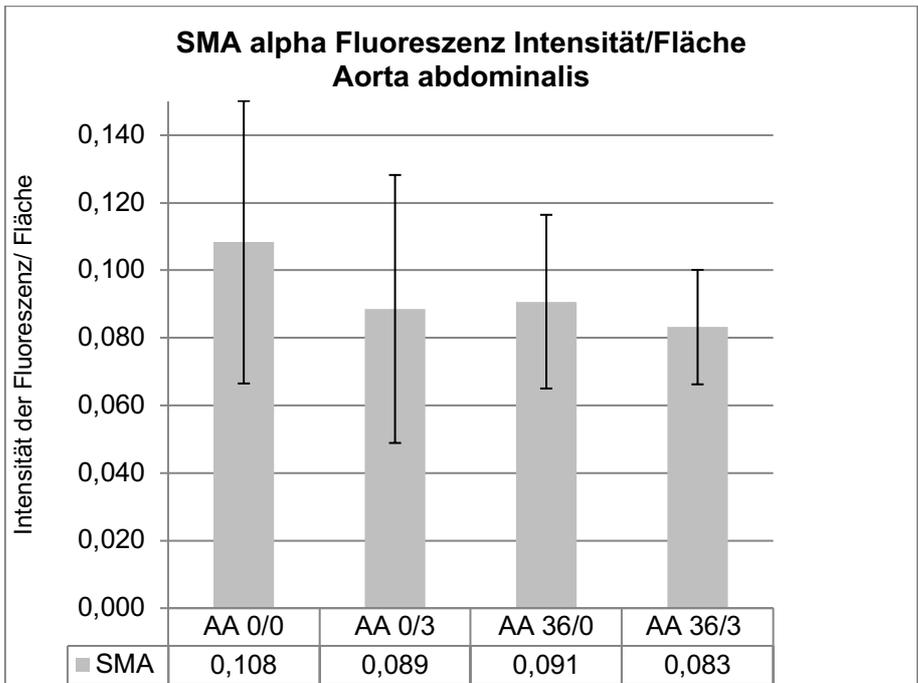


Abbildung 30 - Intensität der SMA alpha Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta abdominalis

Ebenfalls erfolgte für den abdominalen Abschnitt die Auswertung mittels Boxplot, zeigte sich erneut die weiteste Verteilungsbreite für die direkte Entnahme ohne weitere Verarbeitung (AA 0/0), die folgenden Gruppen ergaben eine reduzierte Verteilungsbreite mit ähnlichem Median bzw. Mittelwert, entsprechend der oben angeführten Auswertung. (Abbildung 31) In der Gruppe nachfolgender Kaltlagerung ohne postmortal verzögerte Entnahme ergibt sich eine Probe, welche mit höheren Intensitätswerten nach oben ausreißt.

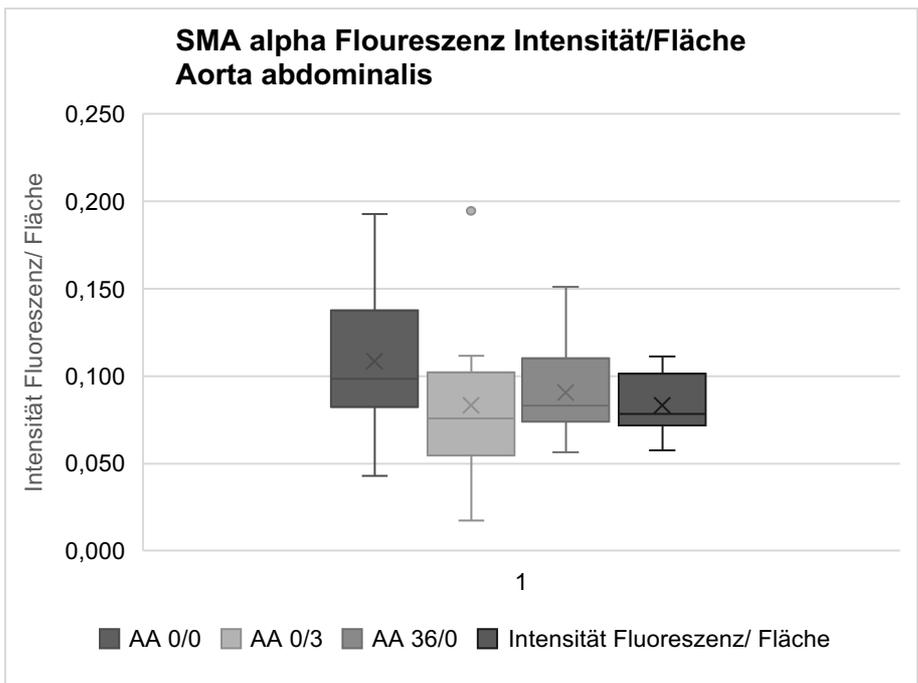


Abbildung 31- Intensität der SMA alpha Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta abdominalis in Boxplot Darstellung

Im Vergleich der aortalen Abschnitte zeigen sich somit die thorakalen Anteile mit einer gefärbten geringeren Intensität pro Flächeneinheit gegenüber den abdominalen Abschnitten. Jedoch bleibt die Intensität über die verschiedenen Gruppen weitgehend gleich, es ergibt sich keine nennenswerte Ab- bzw. Zunahme. (Abbildung 32)

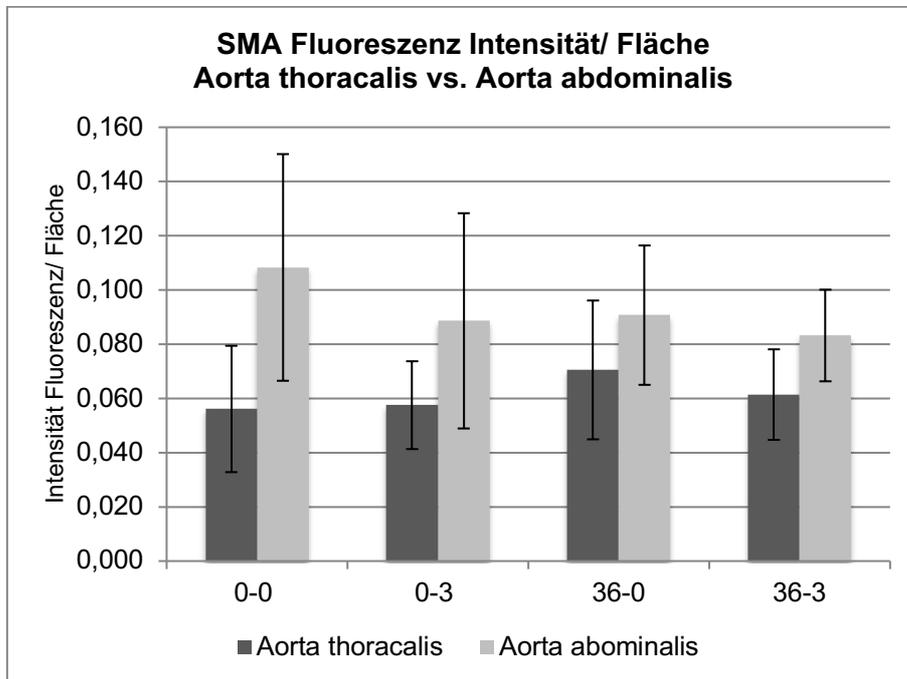


Abbildung 32- Intensität der SMA alpha Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis und Aorta abdominalis in Gegenüberstellung

4.2.4 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

4.2.4.1 Aorta thoracalis

Für die Gruppe des thorakalen Abschnittes mit direkter Entnahme und sofortiger Weiterverarbeitung (AT 0/0) ergibt sich ein Durchschnittswert der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit von 0,0373 (+/- 0,014). Bei direkter Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3) zeigt sich eine Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit von 0,0306 (+/- 0,007). Für die Gruppe der verzögert postmortal entnommenen Gefäßabschnitte ergibt sich mit direkter Verarbeitung (AT 36/0) eine Mittelwertberechnung von 0,0335 (+/- 0,0108), sowie bei direkt verzögerter postmortaler Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 36/3) ein Mittelwert von 0,024 (+/- 0,008). (Abbildung 33)

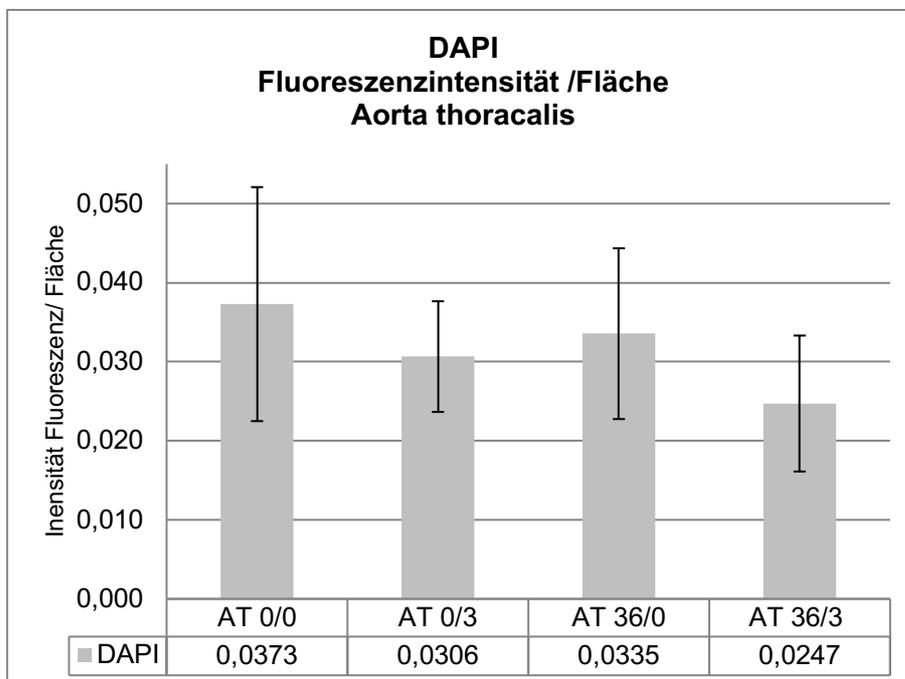


Abbildung 33- Intensität der DAPI-Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis

In der Darstellung der Fluoreszenzintensität pro Fläche mittels Boxplot ergibt sich eine größere Verteilungsbreite mit Abweichung des Medians vom Mittelwert für die Gruppe der direkten Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0). Insgesamt gesehen ergibt sich eine Abnahme der Intensität pro Fläche nach Kaltlagerung mit einhergehender geringerer Verteilungsbreite. (Abbildung 34)

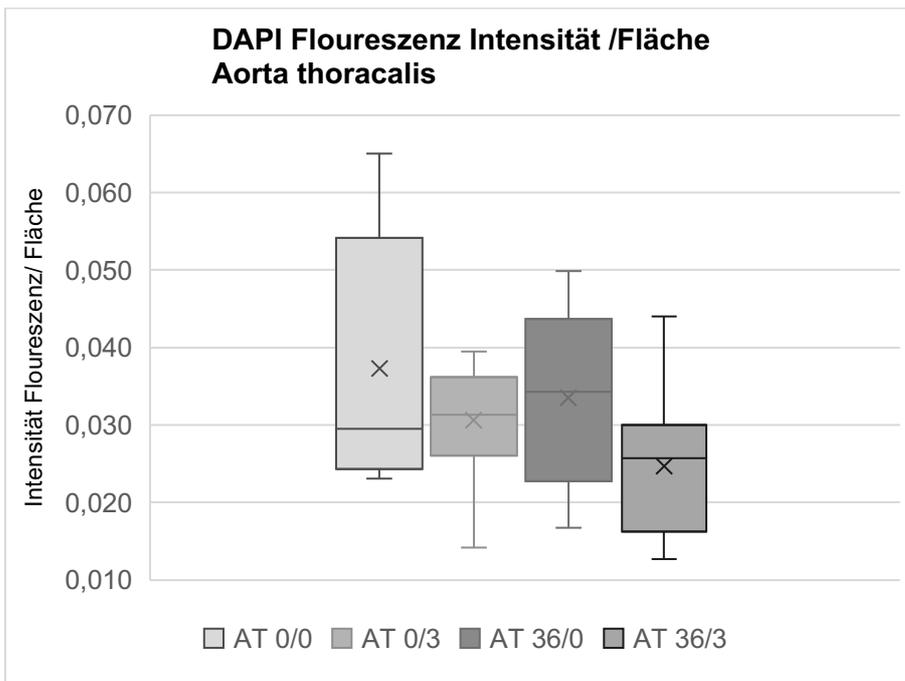


Abbildung 34- Intensität der DAPI-Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis in Boxplot Darstellung

4.2.4.2 Aorta abdominalis

In der Durchsicht der Zellkerne des abdominalen Abschnittes hinsichtlich der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit ergibt sich bei direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AA 0/0) ein Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 0,0711 mit einer Standardabweichung 0,0394. Bei direkter Entnahme mit verlängerter Kaltlagerung des Gefäßes (AA 0/3) zeigt sich eine Fluoreszenzintensität pro Fläche von 0,0788 mit einer Standardabweichung von 0,0342.

Nach verzögerter postmortaler Entnahme der Aorta abdominalis ergibt sich ein Mittelwert für die Gruppe ohne Kaltlagerung (AA 36/0) von 0,0302 mit einer Standardabweichung von 0,0064, nach entsprechender Kaltlagerung in TiProtec®-Lösung beträgt der Mittelwert 0,0333 mit einer Standardabweichung von 0,0109. (Abbildung 35)

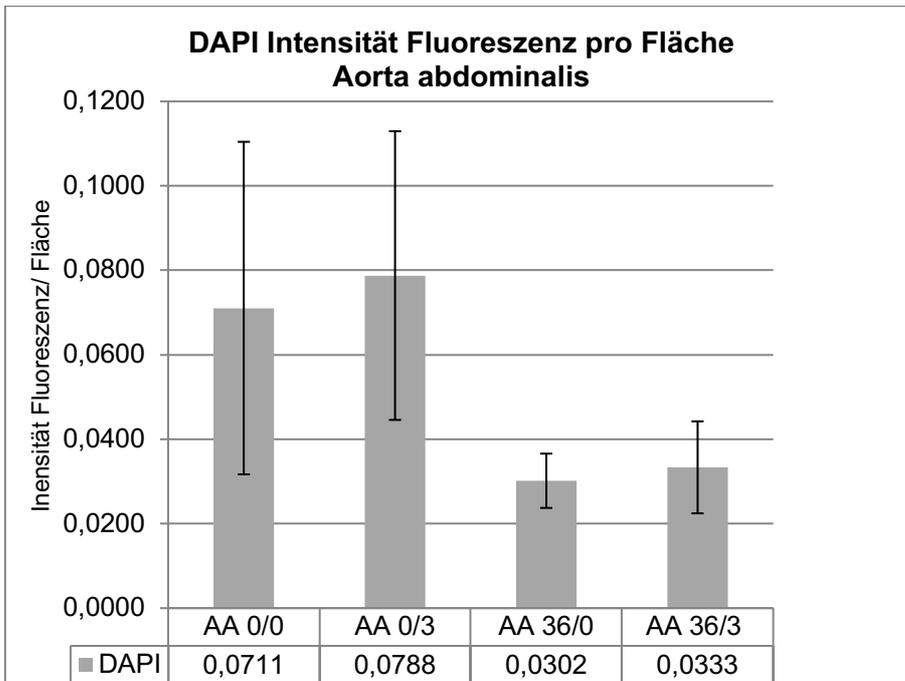


Abbildung 35- Intensität der DAPI-Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta abdominalis

In der Boxplot Darstellung der abdominalen Aorta zeigt sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Entnahmezeitpunktes des Präparates, bleibt die Fluoreszenzintensität nach direkter Entnahme mit und ohne Kaltlagerung fast gleichwertig erhalten, jedoch zeigt sich nach verzögerter postmortaler Entnahme ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenzintensität, welcher ebenfalls nachfolgender Kaltlagerung vorhanden bleibt. (Abbildung 36)

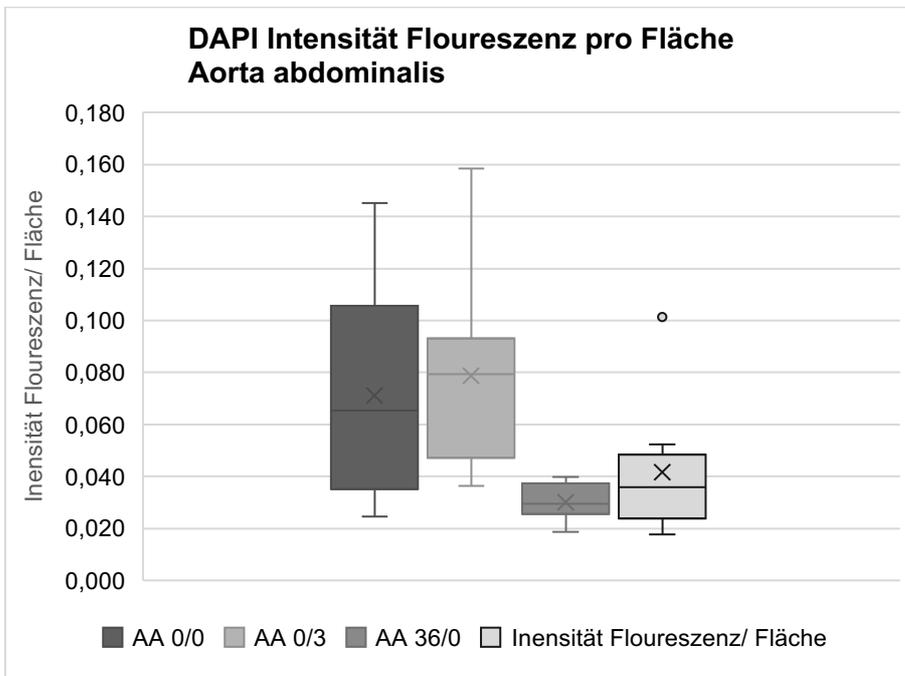


Abbildung 36- Intensität der DAPI-Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta abdominalis

In Gegenüberstellung der abdominalen zu den thorakalen Abschnitten ergibt sich somit eine deutlich erhöhte Fluoreszenz in den abdominalen Abschnitten nach direkter Entnahme. Nach verzögerter postmortaler Entnahme kommen sich die abdominalen und thorakalen Abschnitte hinsichtlich der Intensität näher. (Abbildung 37)

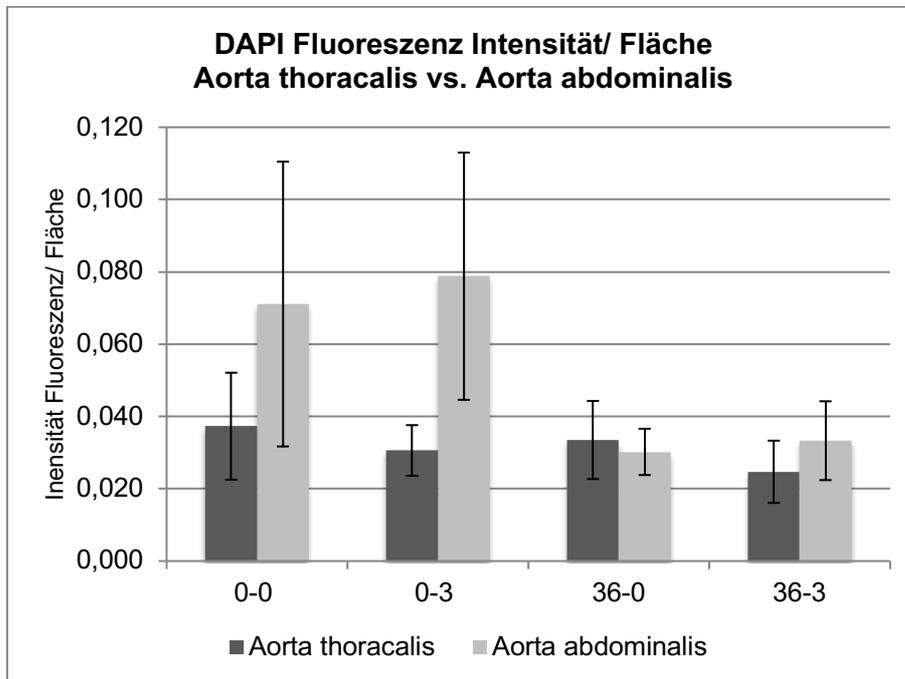


Abbildung 37- Intensität der DAPI-Fluoreszenz (in Intensität/ Fläche) der Aorta thoracalis und Aorta abdominalis in Gegenüberstellung

4.2.5 Beispielbilder der Triplefärbung (Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha), 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Cluster of Differentiation 31 (CD31)) für die abdominale und thorakale Aorta

Im nachfolgenden Abschnitt sollen exemplarische Beispielbilder zu den unterschiedlichen Entnahme- und Lagerungszeitpunkten, jeweils für die abdominale sowie thorakale Aorta.

Hierbei kommt die Immunhistochemische Triplefärbung mit DAPI in blau (links oben), SMA alpha in grün (rechts oben), CD31 in rot (links unten) und in Kombinationsbetrachtung (rechts unten) zur Darstellung. (Abbildung 38 bis Abbildung 41)

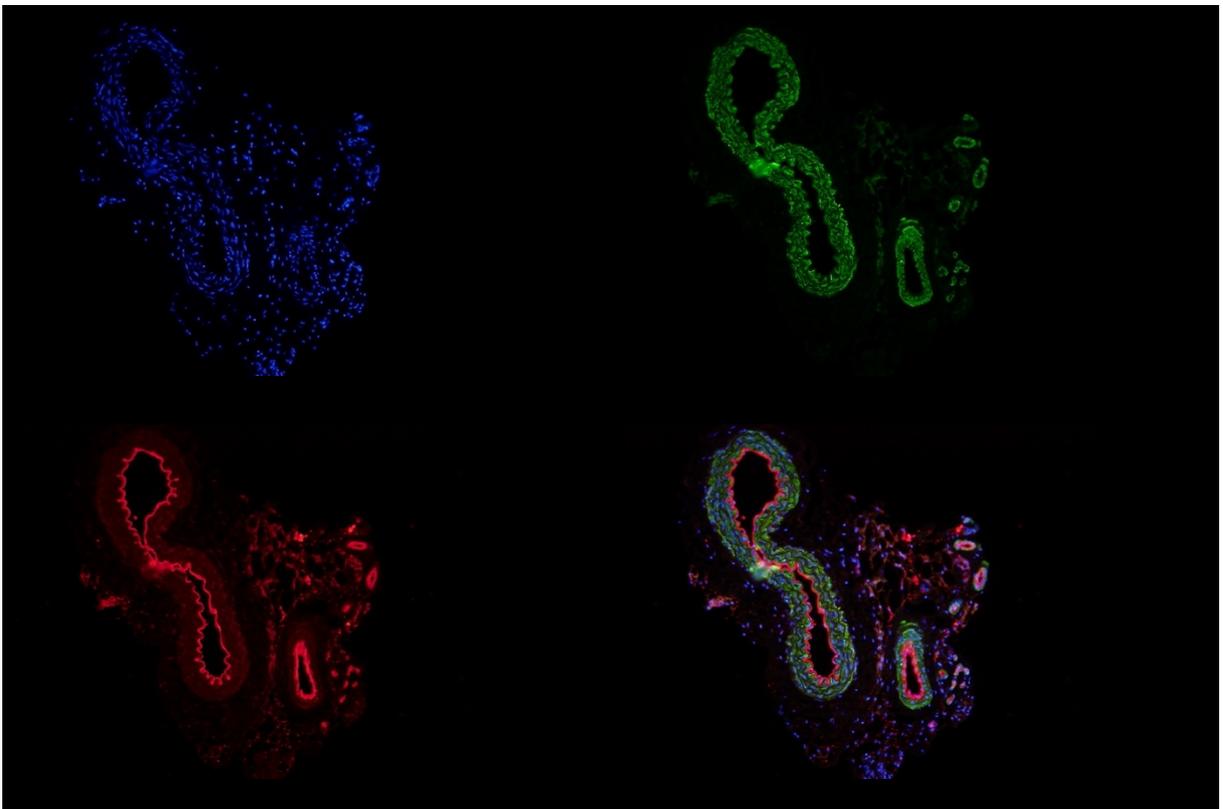
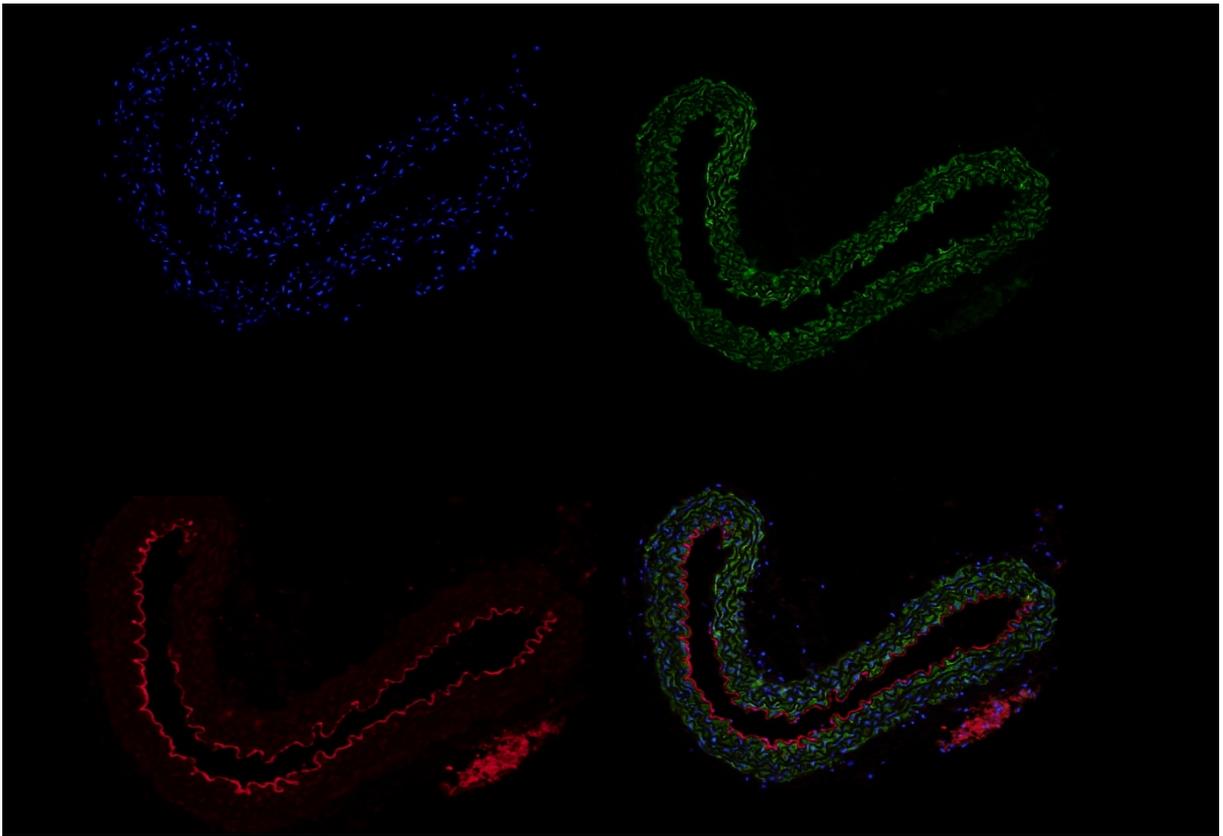


Abbildung 39- Aorta thoracalis (oben) und Aorta abdominalis (unten) nach direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0, AA 0/0)

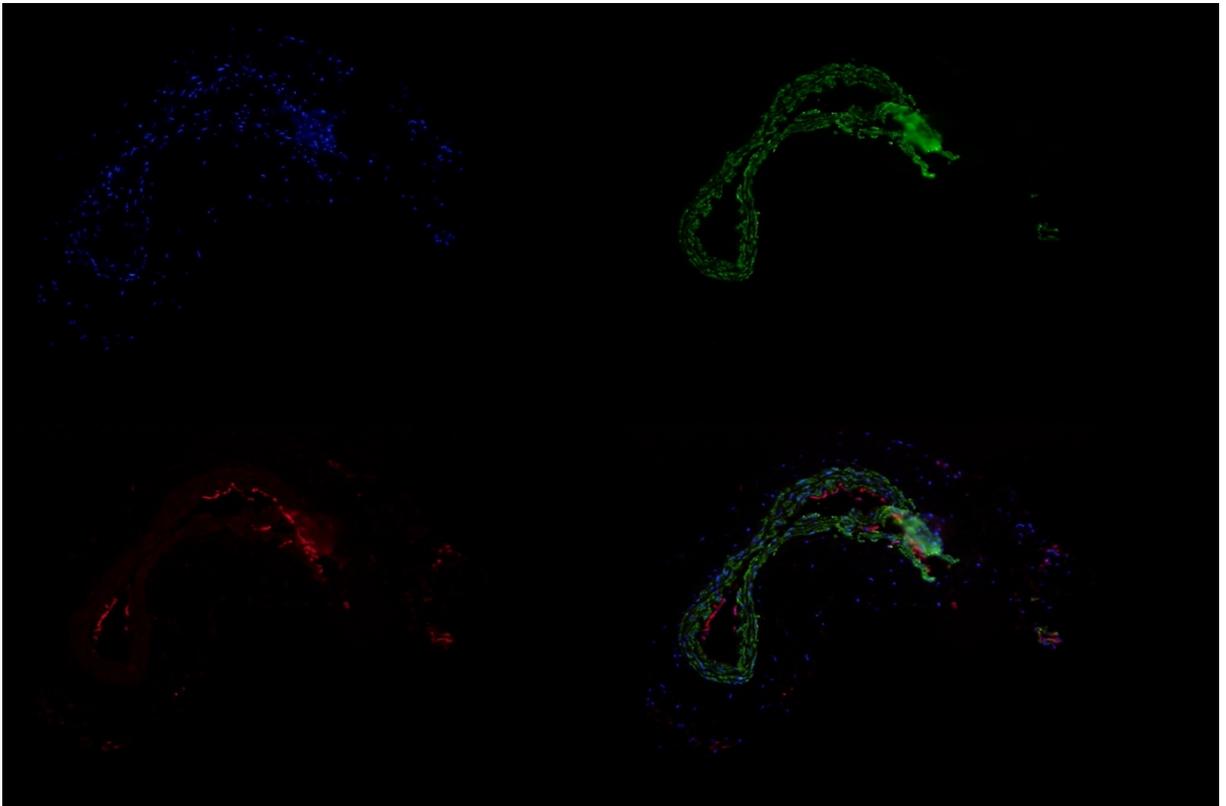
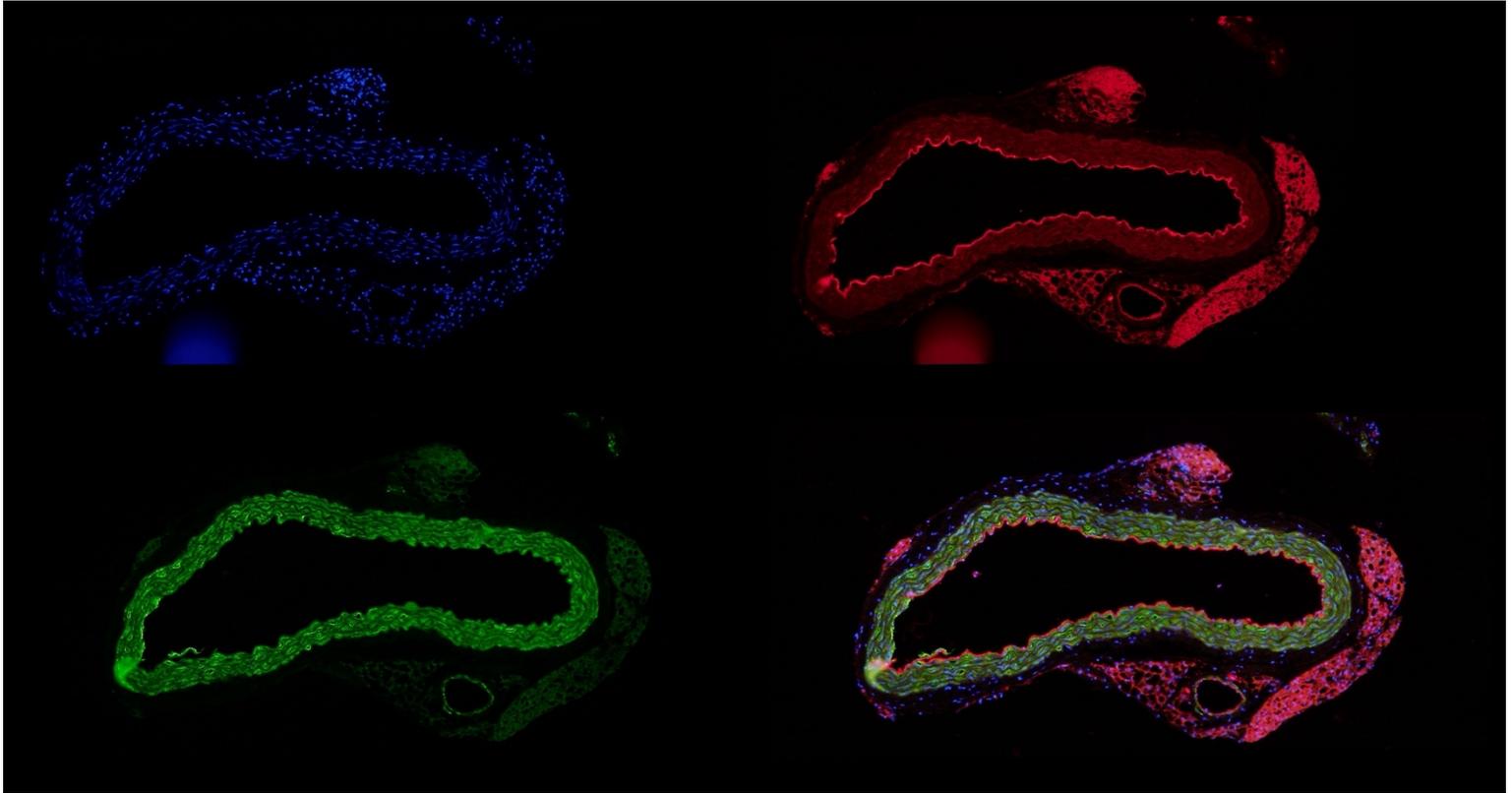


Abbildung 40- Aorta thoracalis (oben) und Aorta abdominalis (unten) nach verzögerter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/0, AA 36/0)

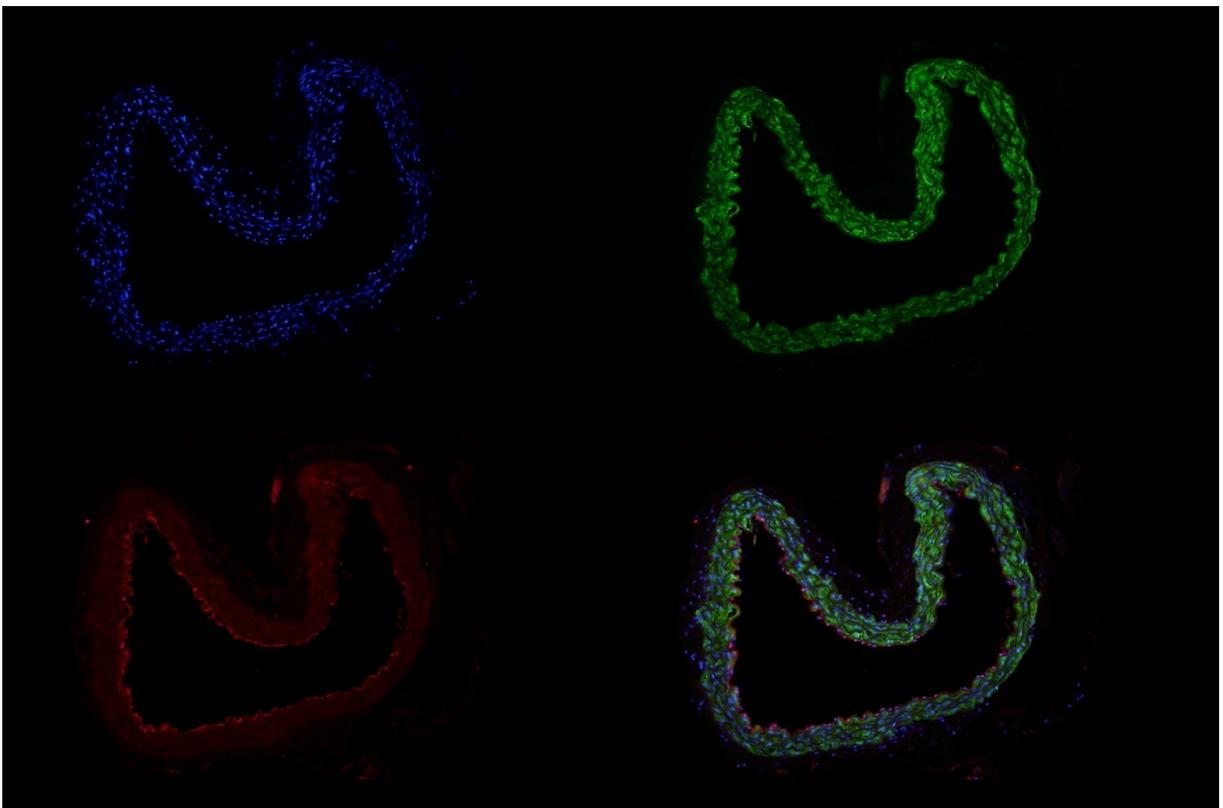
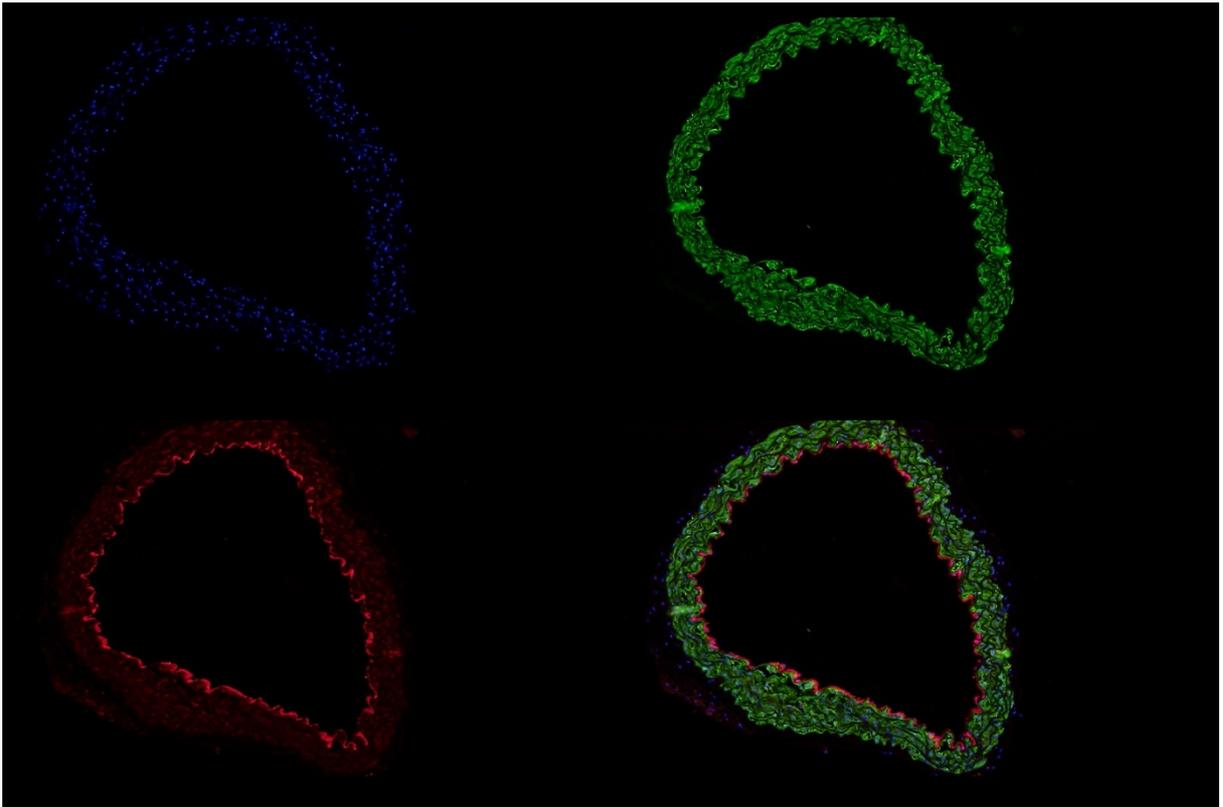


Abbildung 41- Aorta thoracalis (oben) und Aorta abdominalis (unten) nach direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/3, AA 0/3)

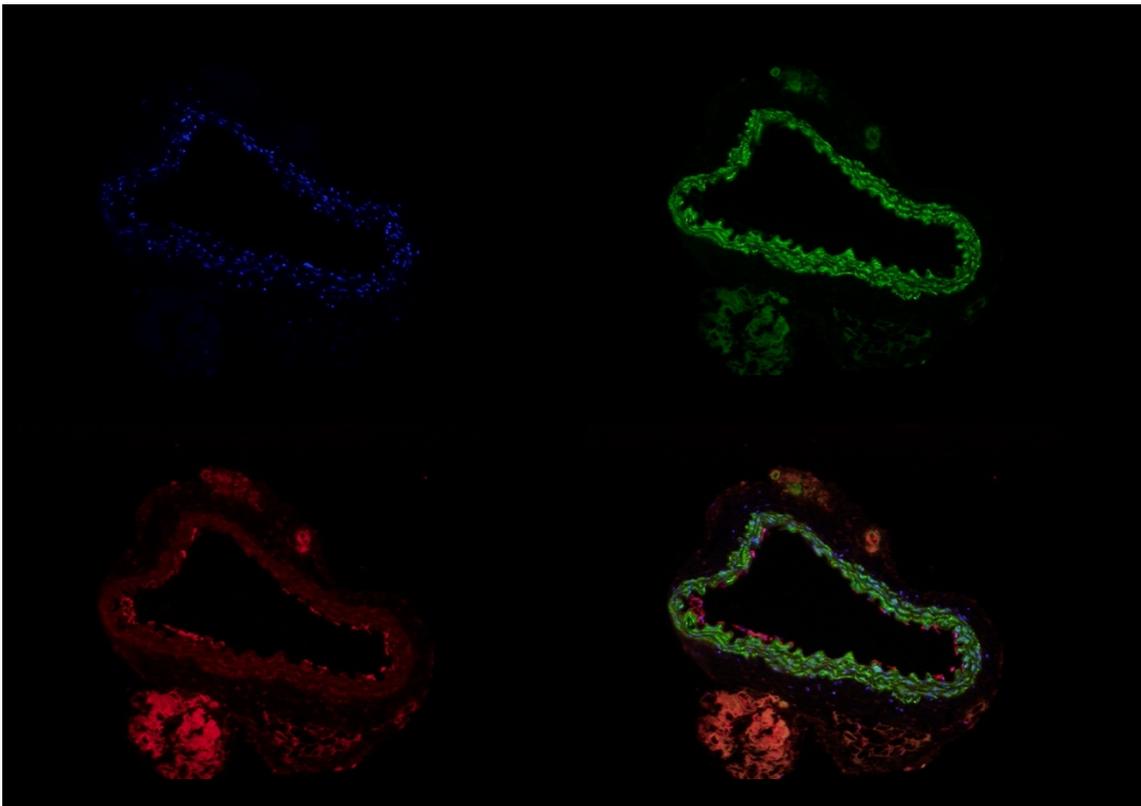
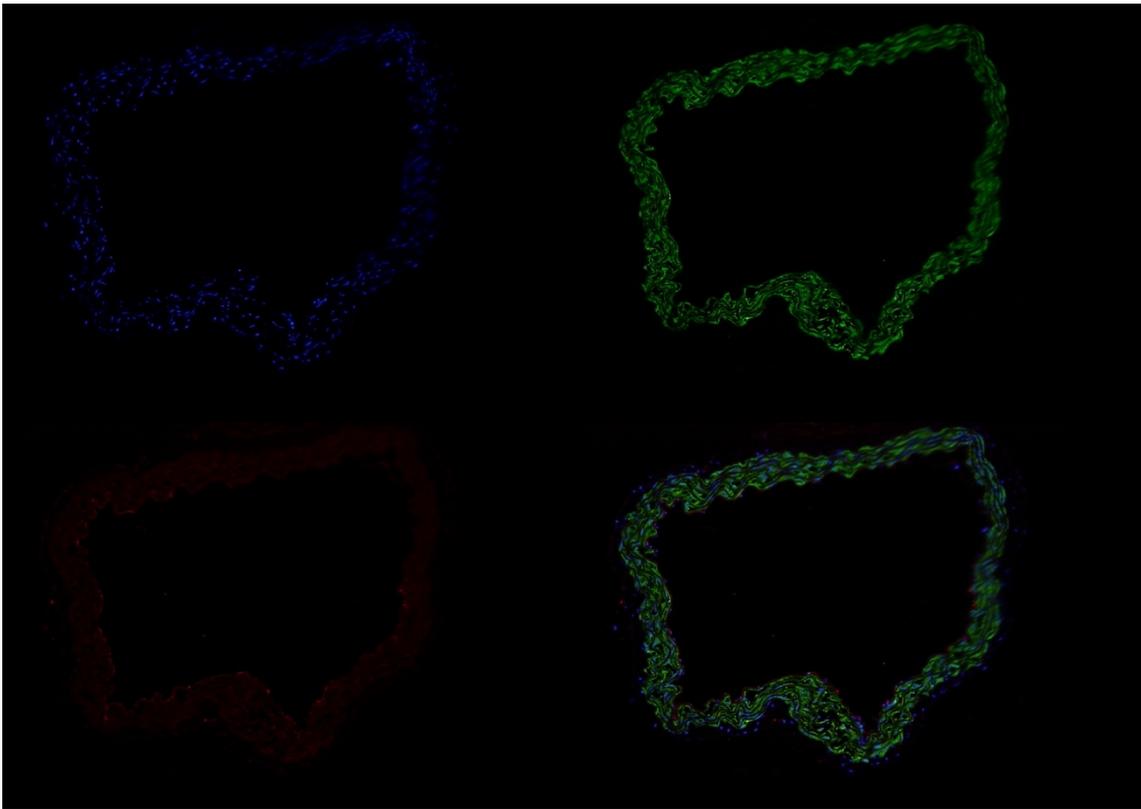


Abbildung 42- Aorta thoracalis (oben) und Aorta abdominalis (unten) nach direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/3, AA 36/3)

4.2.6 Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

4.2.6.1 Aorta thoracalis

Ein Nachweis von TUNEL positiven Zellen konnten in keiner Probe der Gruppe der direkten Entnahme ohne Kaltlagerung festgestellt werden. (Abbildung 43/ Abbildung 45) Hingegen zeigt sich nach Kaltlagerung der Gefäße nach direkter Entnahme eine Zunahme der TUNEL positiven Zellen in allen Zellschichten, sowie eine Zunahme der Anzahl. Hierbei ergeben sich in der Intima fünf Proben ohne TUNEL positive Zellen, vier vereinzelt positiven Proben und eine mit mittlerer Anzahl an TUNEL positiven Zellen. In der Media zeigt sich ein ähnliches Muster, es finden sich acht Proben ohne positiven TUNEL Nachweis, sowie zwei Proben mit vereinzelt positiven Zellen. Für die Adventitia sind alle Proben mit Nachweis von TUNEL positiven Zellen, wobei drei Proben mit vereinzelt Nachweis, und sieben Proben mit mittlerem Nachweis zur Geltung kommen. In keiner Probe zeigt sich ein Nachweis von reichlich TUNEL positiven Zellen. (Abbildung 43/ Abbildung 46)

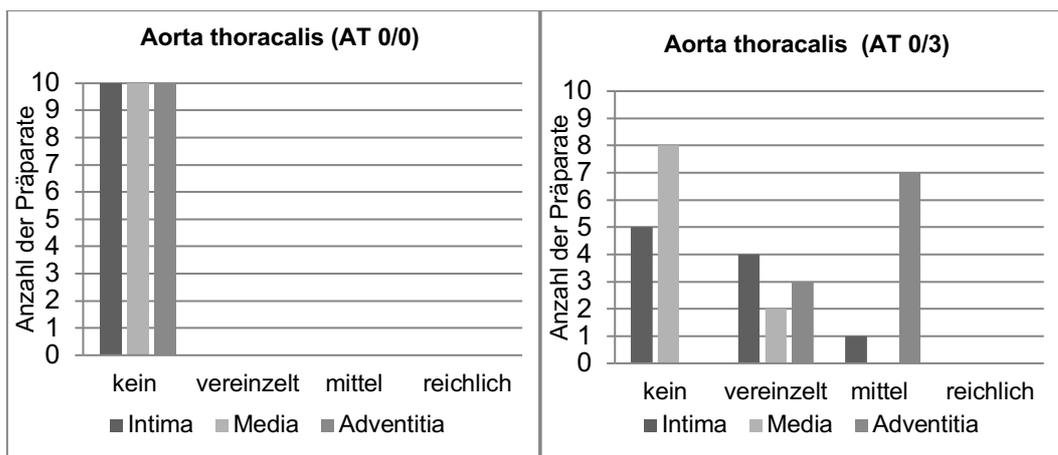


Abbildung 43/ Abbildung 44- Anzahl der Proben mit TUNEL positiven Zellen der Aorta thoracalis nach direkter Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung (AT 0/0) und (AT 0/3)

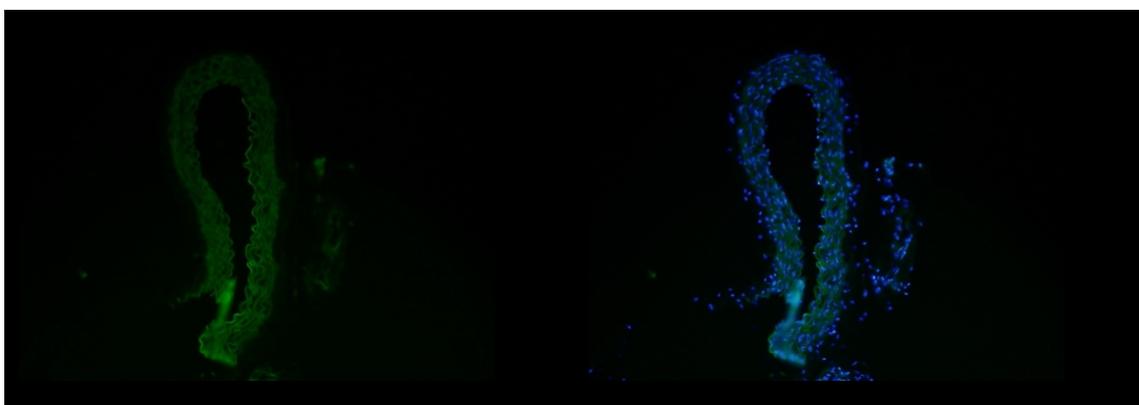


Abbildung 45 Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta thoracalis direkte Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0)

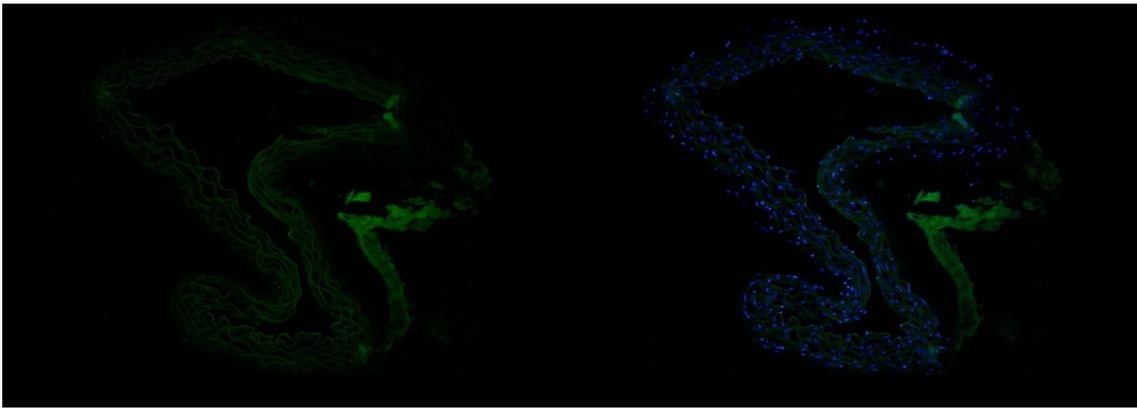


Abbildung 46 Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta thoracalis direkte Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3)

Für die Gruppe der verzögerten postmortalen Entnahme ohne folgende Kaltlagerung zeigen sich keine TUNEL positiven Zellen in der Intima und Media in allen Proben, jedoch lassen sich in der Adventitia in vier Proben vereinzelt TUNEL positive Zellen nachweisen. (Abbildung 47/ Abbildung 49)

In der Versuchsgruppe des thorakalen Aortenabschnittes nach verzögerter Entnahme mit folgender Kaltlagerung zeigt sich ein differenziertes Bild. In der Intima sind fünf Präparate ohne Nachweis von TUNEL positiven Zellen, jeweils eine bzw. vier Proben weisen einen vereinzelt bzw. mittleren Nachweis von TUNEL positiven Zellen auf. Für den Gefäßabschnitt der Media lassen sich bei drei Proben keine positiven Zellen detektieren, jeweils drei Präparate haben den Nachweis von vereinzelt bzw. mittlere und ein Präparat mit reichlich TUNEL positiven Zellen. In der Adventitia ergibt sich für alle 10 Proben ein TUNEL positiver Nachweis, es ist eine Probe mit vereinzelt Zellen, sechs mit mittleren und drei mit reichlichem Nachweis. (Abbildung 47/ Abbildung 50)

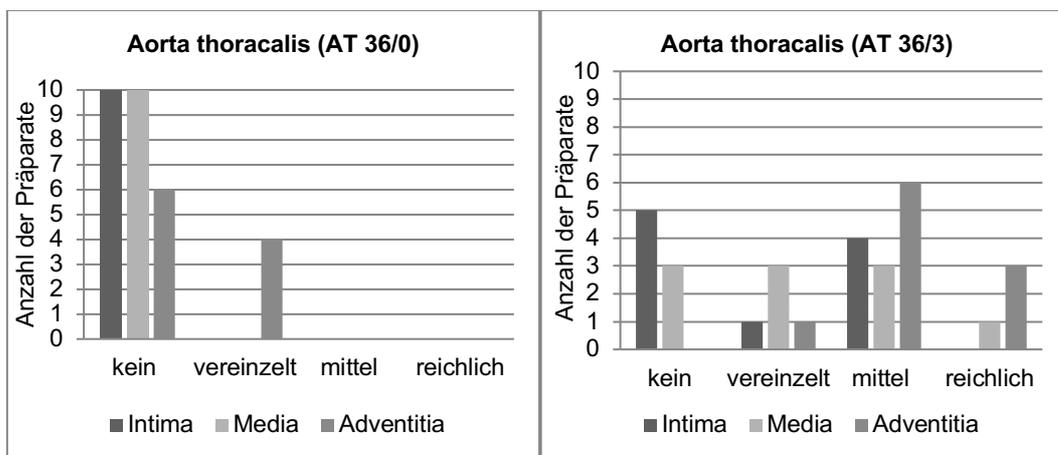


Abbildung 47/ Abbildung 48 Anzahl der Proben mit TUNEL positiven Zellen der Aorta thoracalis nach verzögerter postmortalen Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung (AT 36/0) und (AT 36/3)



Abbildung 49- Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta thoracalis verzögerte Entnahme ohne folgende Kaltlagerung (AT 36/0)

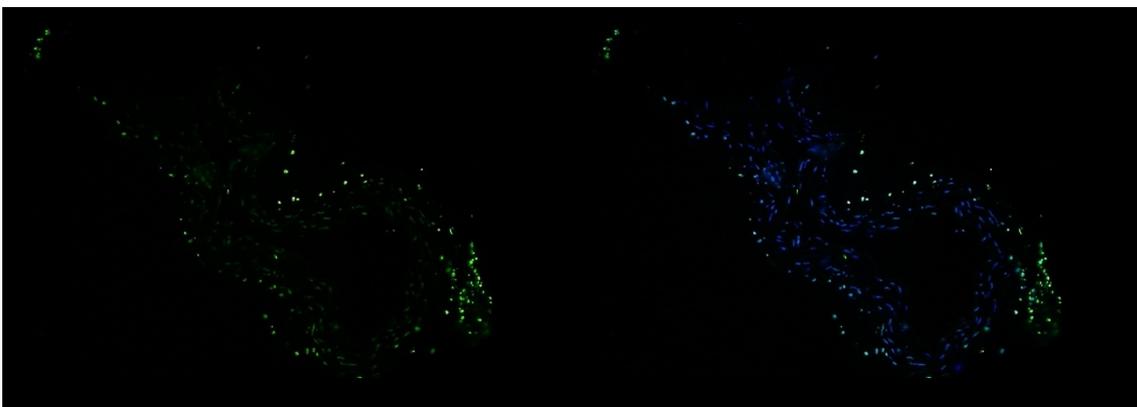


Abbildung 50 - Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta thoracalis verzögerte Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 36/3)

4.2.6.2 Aorta abdominalis

In der Gruppe der direkten Entnahme ohne Kaltlagerung des abdominalen Abschnittes (AA 0/0) zeigten sich keine TUNEL positiven Zellen. (Abbildung 51/ Abbildung 53) Nach erfolgter Kaltlagerung nach direkter Entnahme zeigen sich TUNEL positive Zellen insb. Im Bereich der Intima und Adventitia. Für die Intima sind drei Proben ohne Nachweis von TUNEL positiven Zellen, fünf Proben mit vereinzelt und zwei mit mittlerer Positivität von TUNEL positiven Zellen. In der Media ergeben sich neun Proben ohne Nachweis von TUNEL positiven Zellen, eine Probe mit vereinzelt Zellen. In der Adventitia sind sechs Proben mit vereinzelt positivem Nachweis, vier mit mittlerem Nachweis. (Abbildung 51/ Abbildung 54).

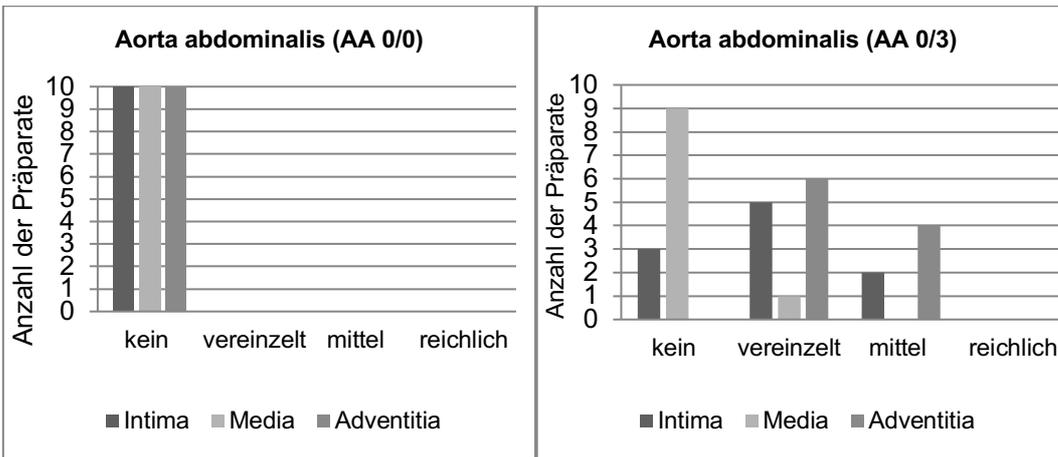


Abbildung 51/ Abbildung 52- Anzahl der Proben mit TUNEL positiven Zellen der Aorta abdominalis nach direkter postmortaler Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung (AA 0/0) und (AA 0/3)

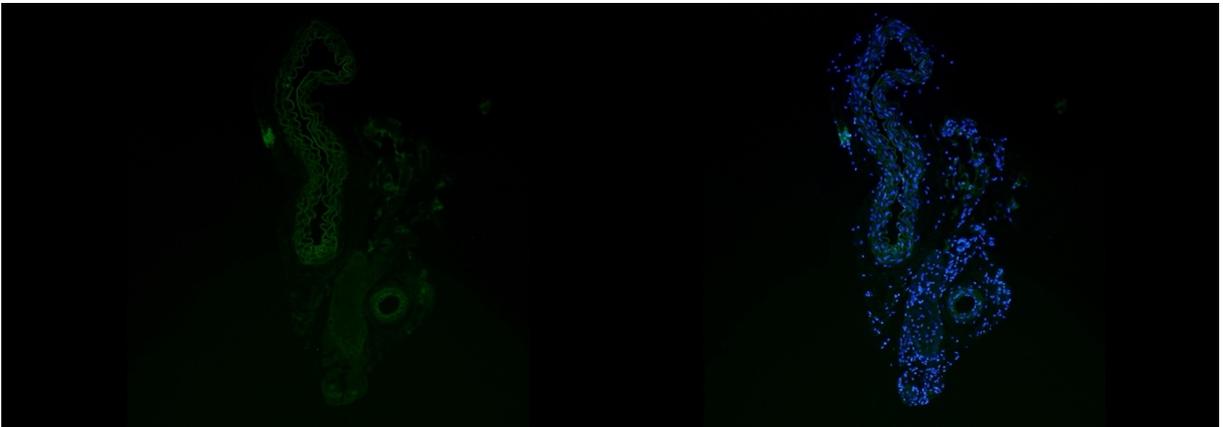


Abbildung 53- Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta abdominalis direkte Entnahme ohne folgende Kaltlagerung (AA 0/0)

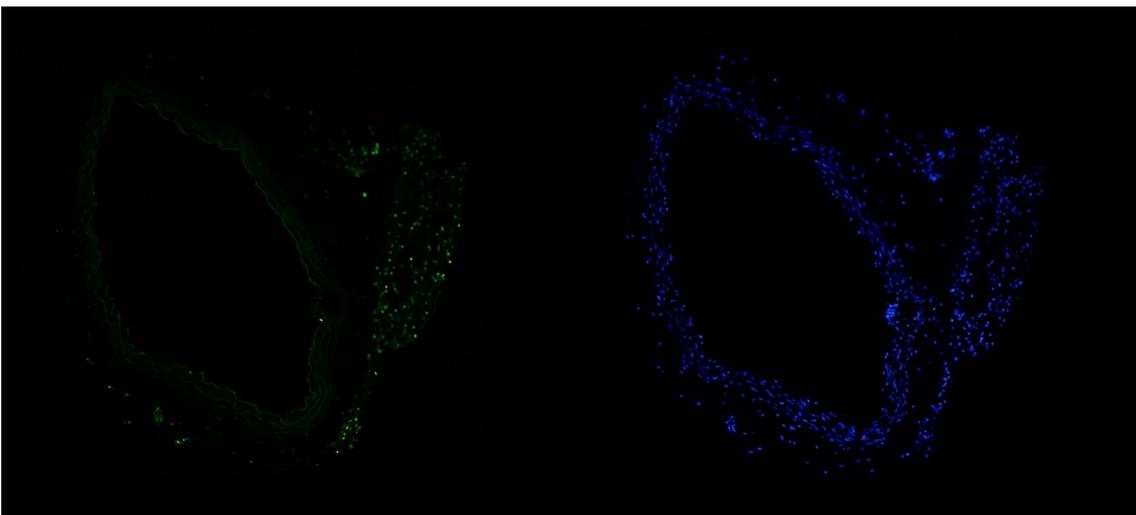


Abbildung 54- Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta abdominalis direkte Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 0/3)

Für die Gruppe der abdominalen Aortenabschnittes nach verzögerter postmortaler Entnahme (AA 36/0) und ohne weitere Kaltlagerung zeigen sich alle Proben ohne Nachweis einer TUNEL Färbung in der Intima, die Gefäßschichten der Media und Adventitia zeigen vereinzelt bzw. mittel positive Zellen. Dabei können acht Präparate in der Media ohne Nachweis von TUNEL positiven Zellen ausgemacht werden, jeweils ein Präparat weist vereinzelt bis mittlere Anzahl an TUNEL positiven Zellen auf. Für die Adventitia zeigt sich ein Nachweis von sieben Präparaten mit vereinzelt TUNEL positiven Zellen, drei sind ohne Nachweis. (Abbildung 55/ Abbildung 57)

Bei der Auswertung der abdominalen Aorta nach verzögerter Entnahme und folgender Kaltlagerung ergibt sich ein diverseres Bild. Insgesamt sind neun Präparate auswertbar gewesen. Für die Intima sind acht Präparate ohne Nachweis einer TUNEL Anfärbung, eine ist mit vereinzelt Nachweis. In der Media lassen sich fünf Präparate ohne Anfärbung darstellen und zwei mit jeweils einem mittleren bzw. reichlichen Färbungsnachweis. Für die Adventitia ergibt sich folgende Verteilung, vier Präparate ohne positiven Färbungsnachweis, jeweils zwei Präparate mit mittlerer bis reichlicher Anfärbung, und ein Präparat mit vereinzelter Färbung. (Abbildung 55/ Abbildung 58)

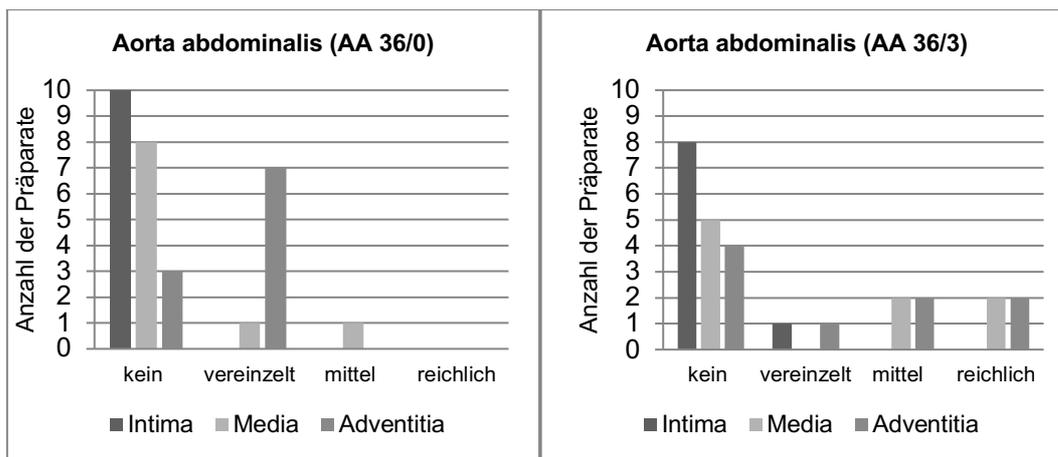


Abbildung 55/ Abbildung 56- Anzahl der Proben mit TUNEL positiven Zellen der Aorta abdominalis nach direkter postmortaler Entnahme mit und ohne folgender Kaltlagerung (AA 36/0) und (AA 36/3)

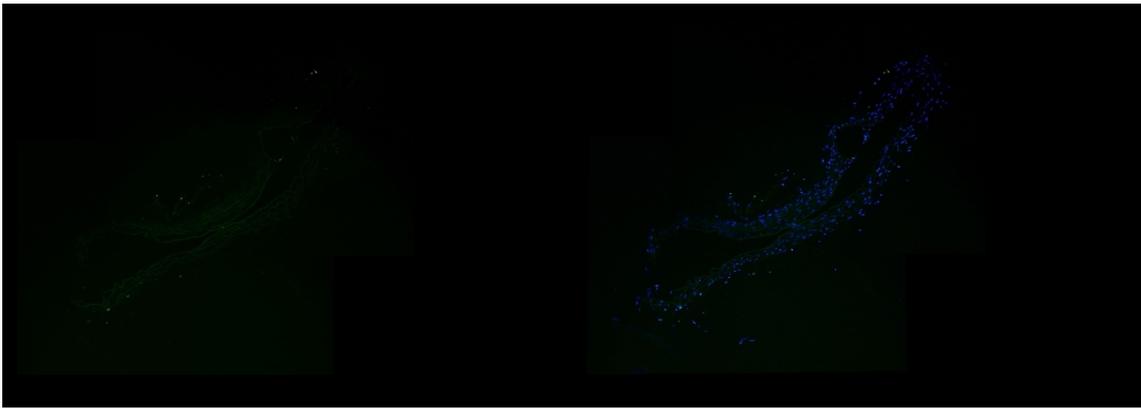


Abbildung 57- Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta abdominalis verzögerte Entnahme ohne folgende Kaltlagerung (AA 36/0)

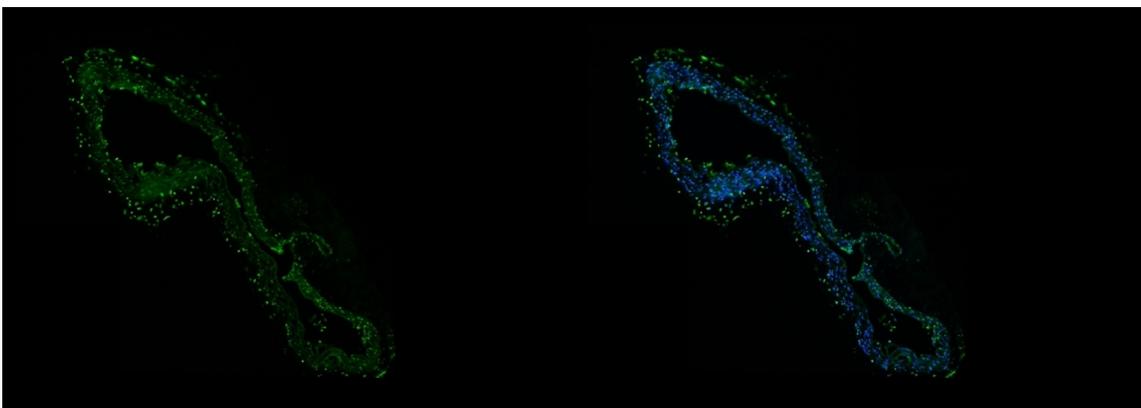


Abbildung 58- Doppelfärbung TUNEL positive Zellen in grün (links) und DAPI in blau in Kombination (rechts)- Aorta abdominalis verzögerte Entnahme und folgender Kaltlagerung (AA 36/3)

5 Diskussion

5.1 Mikrobiologie

Zur Analyse der einer quantitativen und qualitativen bakteriellen Besiedlung der Proben wurde die mikrobiologische Aufarbeitung durchgeführt.

In Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse zeigten sich alle Nullproben der Versuchslösung steril, sodass eine durch die Versuchslösung hervorgerufene Kontamination ausgeschlossen werden kann. Ebenfalls ergab sich in keiner durchgeführten Untersuchung der Anhalt eines Pilz- oder Hefewachstums.

Im Jahre 2010 beschrieb Bisdas einen Dekontaminationscocktail, welcher zu einem breiten antibiotischen Mix ebenfalls ein Antimykotikum (Amphotericin B) enthielt. (7,10) Hiernach waren auf den untersuchten Homografts keine weiteren antimikrobiellen Nachweise möglich. Eine Zugabe von einem Antimykotikum wäre in den vorliegenden Ergebnissen nicht notwendig, auch erfolgt zumeist der Nachweis von bakterieller Besiedlung. Jedoch ist eine Zugabe eines Antimykotikums zur besseren Versorgung in bereits vorerkrankten Patienten mit möglicherweise depletierter Immunsituation und in Prävention eines systemischen bzw. lokalen Neuinfektes des Gefäßersatzes sicherlich zu diskutieren.

5.1.1.1 Thorakale Aorta

Mit der andauernder Lagerungszeit zeigt sich eine Zunahme von Kolonien bildenden Einheiten (KBE) über die Versuchsgruppe, welche mit einer Zunahme der maximalen Anzahl an KBE pro Versuchsprobe einhergeht. Diese Beobachtung kann ebenfalls für die verzögerte postmortale Entnahme der Aortenabschnitte nach 36 Stunden gemacht werden, wobei sich bereits in der Gruppe ohne Kaltlagerung (AT 36/0) ein höherer Anteil an KBE mit reichlichem Besiedlungswachstum zeigt. Eine Zunahme der KBE über die Zeit, insbesondere mit länger dauernder Kaltlagerung ist somit zu beobachten.

Vergleicht man die Anzahl der Proben der einzelnen Versuchstiere über die Lagerungsdauer, lässt sich ebenfalls ein Anstieg der KBE mit einer quantitativen Zunahme der Besiedlungsintensität feststellen. Weiterhin zeigt sich eine Kumulation des Nachweises von mehreren unterschiedlichen Bakterien-species pro Probe eines Versuchstieres über die Lagerungsdauer. Dieser Effekt zeigt sich bei den direkt postmortalen, wie auch den verzögert postmortal entnommenen Aortenabschnitten.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass sich bereits nach der Entnahme insbesondere anaerobe Species vermehren, wie oben aufgeführt.

Im Blick auf die durchgeführte Bestimmung der Bakterienspecies zeigt sich das Bild einer Besiedelung der Proben mit zumeist fakultativ pathogener Haut- bzw. Schleimhaut und gastrointestinalen Bakterienspecies. Es lässt sich konstatieren, dass die Gruppe der (AT 0/0) Haut- bzw. Schleimhautkeime aufweist, nach entsprechender Lagerungszeit (AT 0/3) in der Kaltlagerung über 3 Wochen lassen sich vermehrt gastrointestinale Species nachweisen. Im Rahmen der Kaltlagerung in der Versuchslösung TiProtec®, ist von einer weitgehend anaeroben Situation des Lösungsmediums auszugehen. Es zeigt sich daher eine Verschiebung der bakteriellen Besiedelung hin zu fakultativ anaerob bzw. anaerober Bakterienspecies. Ein Einfluss auf die nachgewiesenen Species können autolytische Prozesse mit möglicher Durchwanderung durch die Darmwand haben. Es finden sich vermehrt oben genannte Bakterienspezies, welche weitgehend im abdominalen Aorten Proben nachweisbar waren.

Interessanterweise lassen sich bei direkter Entnahme und folgender Kaltlagerung vermehrt anaerob wachsende Gruppen nachweisen, wohingegen bei der verzögerten postmortalen Entnahme sich nach der Kaltlagerung über 3 Wochen sowohl aerobe wie auch anaerobe Species zeigen.

Bei verzögerter postmortaler Entnahme der Gefäßabschnitte ergibt sich ein ähnliches Bild, es zeigen sich ebenfalls in der Gruppe (AT 36/0) Haut- bzw. Schleimhautspecies. Hinzu ergeben sich vereinzelt gastrointestinale Besiedlungen. Im Rahmen der Präparation erfolgte die Perfusion des kardiovaskulären Systems mittels einer kühlen Perfusionslösung, welche bei Entlastung im rechten Vorhof zu einer geringen Kontamination geführt haben könnte. Weiterhin ist eine mögliche Migration in dem Zeitraum der „warmen“ Lagerungsdauer postmortal vorstellbar, ebenso eine Translokation der fakultativ anaeroben und damit meist enterischen Bakterien in die umgebenden Organe und Gewebe, eben auch in das Gefäßsystem.

Ebenfalls zeigt sich in der Gruppe (AT 36/3) eine Zunahme der Besiedlungsintensität über die Kaltlagerungsdauer. Jedoch lassen sich weiterhin aerobe Bakterienspecies nach der Kaltlagerung nachweisen.

In den meisten etablierten Gewebebanken werden nach der Entnahme gemäß den vorhandenen Aufbereitungsprotokollen die Gefäßabschnitte bzw. Herzklappen vor der Kryokonservation in einer Präservationslösung unter Zusatz verschiedener Antibiotika für 23-48 Stunden kalt gelagert. (36) (37) Bereits lässt sich ein Anteil an mikrobiell besiedelten Proben feststellen, welche nach Aufarbeitung und zusätzlicher Gabe von Antibiotika und Antimykotika in den Verlaufskontrollen negative Befunde zeigen. Die Kontamination von postmortal entnommenen Herzklappen und Gefäße wurde durch Jashari et. al mit 33% angegeben, wobei dies auf eine gesamte Anzahl von nur 6

Kadaverspenden gewertet wurde, die angegebene Kontamination sollte sich im Rahmen weiterer Studien mit größerem Kollektiv überprüft werden. (36,38,39)

In Deutschland ist eine standardisierte Lagerung der vaskulären Graft- bzw. Gefäßpräparate nach Präparation in einer Kombinationslösung mit unterschiedlichen Substanzen üblich, wie zum Beispiel Bisdas et. al eine regelmäßige Anwendung von Meropenem, Colistin, Tobramycin, Vancomycin und Amphotericin B als Dekontaminations- Kombination beschrieben. Dabei konnte bereits vor der Lagerung bei 35/55 Homografts eine Kontamination mit Bakterien nachgewiesen werden, welche nach Lagerung in der oben genannten Lösung auf 3/35 sank. (10)

Gemäß der Europäischen Empfehlung zur Qualitätssicherung bei Organen, Geweben und Zellen wird bei Entnahme eine regelmäßige mikrobiologische Untersuchung, insbesondere vor Beginn der Lagerungszeit empfohlen. (37,39)

Kongruent zur Gruppe der direkten postmortalen Entnahme zeigt sich ebenfalls eine Zunahme der Besiedlungsanzahl über die Dauer der Kaltlagerung. Dies scheint in der Kenntnis eines zunehmenden Wachstums fakultativ anaerober Bakterien in Lösungen erwartungsgemäß.

5.1.1.2 Abdominale Aorta

Die bereits für den thorakalen Abschnitt definierten Beobachtungen lassen sich auch in ähnlicher Weise im abdominalen Abschnitt feststellen.

In der quantitativen Anzahl der KBE zeigt sich im abdominalen Gefäßabschnitt ein vergleichbares Bild. Bei der Entnahme direkt postmortal und ohne Kaltlagerungen lassen sich nur vereinzelte KBE nachweisen, hingegen nimmt dies mit der Kaltlagerung zu. Weiterhin lässt sich zusätzlich zur Zunahme der Besiedlungsintensität eine Zunahme der Anzahl verschiedener Bakterienspecies pro Versuchstierprobe verzeichnen.

In der Versuchsgruppe, welche eine verzögerte postmortale Entnahme nach 36 Stunden erfahren hat, ergibt sich in der Gruppe (AA 36/0) eine vereinzelte, mittlere und reichliche Besiedlungsintensität. Es lässt sich über die Kaltlagerungsdauer eine Zunahme der KBE und der quantitativen Besiedlung nachweisen. Ein interessanter Aspekt ist hierbei, dass bereits in der Gruppe (AA 36/0) zwei Versuchstierproben mit einer Mehrfachbesiedlung aufwarten, welche sich hingegen in der Gruppe (AA 36/3) und somit nach der Kaltlagerung nicht in dieser Art nachweisen lassen. Es zeigen sich mehrere Versuchstiere mit einem bakteriellen Wachstum, jedoch nur zwei Proben weisen zwei unterschiedliche Bakterienspecies.

Der Entnahmezeitpunkt scheint somit entscheidender für die Anzahl sowie die Intensität bakterielle Besiedlung und nicht die Lagerungsdauer.

In der qualitativen Analyse der Bakterienspecies lässt sich hauptsächlich ein Mischbild von Haut- bzw. Schleimhaut und gastrointestinalen Besiedler feststellen. Kongruent zur Gruppe der thorakalen Aortenabschnitte zeigen sich insbesondere bei direkter Entnahme ohne Kaltlagerungen mit *Staphylococcus capitis* und *Micrococcus luteus* zwei Haut bzw. Schleimhautspecies.

Bei Entnahme nach 36 Stunden postmortal lassen sich vermehrt gastrointestinale Erreger mit vereinzelt bis reichlicher Wachstumsintensität nachweisen. Eine postmortale Migration ist mit einer Kontamination durch die Präparation bei zunehmend labiler Darmbarriere und durchgeführter intracorporaler Perfusion zu diskutieren.

In Bezug auf die Kaltlagerung über 3 Wochen zeigen sich ein deutlicher Selektionsvorteil von fakultativ anaeroben bzw. anaeroben Bakterienspecies. Es bleibt jedoch eine Mischflora mit Haut und gastrointestinalen Species in der Gruppe der (AA 0/3). Insgesamt ist die Besiedlungsintensität jedoch in acht Fällen vereinzelt einzustufen und nur einmalig als reichlich.

Hingegen in der Gruppe der (AA 36/3) ergeben sich fast ausschließlich gastrointestinale Species, welche in der Versuchslösung in sechs Fällen ein reichliches Wachstum zeigen. Insbesondere zeigt sich der *Enterococcus faecalis* als ein dominierendes Bakterium, welches in der weiteren klinischen Therapie eine hohe Therapierelevanz besitzt.

In Bezug auf eine empirische antibiotische Abdeckung eines Homograft Empfängers muss eine kontroverse Diskussion geführt werden. Nach direkter Entnahme der Gefäßpräparate zeigt sich eine geringe Besiedlung, unabhängig von der Lagerungsdauer. Somit kann eine breite antibiotische Abdeckung auch zu einer höheren Antibiotikaresistenz beitragen. Jedoch entspricht dem aktuellen klinischem Standard die Implantation eines sterilen Homografts. Nur in Notfallindikationen kann eine kryokonserviertes Allograft mit Keimnachweis implantiert werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wäre die regelhafte mikrobiologische Standortbestimmung der Präparate zu favorisieren, hierdurch ist eine kalkulierte antibiotische Therapie möglich. Wie bereits in der Organtransplantation etabliert, sollte in der operativen Implantation des Homografts eine mikrobiologische Probenentnahme vorgenommen werden, sodass weiterhin eine resistogramm gerechte antibiotische bzw. antimykotische Therapie im weiteren Behandlungsverlauf angepasst werden kann.

Eine Diskussion mit Gegenüberstellung wirtschaftliche und medizinische Argumente hinsichtlich eines regelmäßigen Monitorings der Proben ist sicher interdisziplinär zu führen. Sicherlich wäre im Rahmen einer Kaltlagerung das Monitoring der Gefäßersatz einfacher möglich als in der Kryokonservation.

In der aktuellen Situation bleibt eine empirische antibiotische Therapie mit Abdeckung der aeroben und anaeroben Bakterienspecies empfehlenswert.

Wie bereits durch Publikationen bekannt, sind die häufigsten Bakterienspecies nach postmortalen Entnahme den gastrointestinalen bzw. kutanen Species zuzuschreiben. (19,20,40–48)

In der bisherigen Praxis der Kryokonservierung von Gefäßgrafts werden diese über bis zu 48 Stunden in einer Versuchslösung mit Antibiotika Zusatz kalt gelagert, bevor sie der Kryokonservierung zugeführt werden. Entsprechend den vorliegenden Protokollen wurde standardisiert eine antibiotische und antimykotische Mischung mit zum Beispiel Cefoxitin, Lincomycin, Polymixin B und Vancomycin zugesetzt, bevor jeweils eine mikrobiologische Nullprobe entnommen wurde. (36)

Die empirische versus kalkulierte antibiotische Therapie ist daher im Verlauf sicher zu diskutieren, insbesondere im Hinblick auf die zunehmende Resistenzlage. Nicht außer Acht darf jedoch die klinische Situation des Patienten gelassen werden, da Gefäßersatzmaterialien zumeist im Rahmen von septischen Krankheitsgeschehen implantiert werden und Patienten zumeist im Rahmen der septischen Krankheitssituation in einer immunsupprimierten Situation sich befinden. Weiterhin besteht bei Patienten, die einen Gefäßersatz mit Homografts erhalten zumeist eine vorherige bakterielle Besiedlung des Operationsgebietes, aufgrund derer die Indikation zur Implantation gegeben ist. Daher erfolgt bereits präoperative eine breite, zumeist empirische, antibiotische und antimykotische Therapie.

Ein weiterer Punkt der Diskussion besteht sicherlich in der Entnahme der mikrobiologischen Proben bei der Entnahme sowie vor der Implantation. In den vorliegenden Experimenten wurden ein kleiner Gefäßabschnitt und die entsprechende Lagerungsflüssigkeit entnommen und zur mikrobiologischen Untersuchung weiterverarbeitet. Zur sicheren Detektion ist eine Aufbereitung der Lösungsflüssigkeit sowie des Präparates zu fordern. Eine isolierte Untersuchung der Lagerungslösung könnte somit am Präparat anhaftende Species verschleiern.

In beiden aortalen Abschnitten zeigt sich eine Zunahme der Anzahl der Kolonien Bildenden Einheiten (KBE) über die Lagerungsdauer, was zu erwarten war. Die Intensität der Besiedlung ist im abdominalen Abschnitt jedoch deutlicher vorhanden als im thorakalen Abschnitt, sodass in Zusammenschau mit der Bakterienspezies eine Translokation des Darmes als Ursache möglich scheint.

Weiterhin ist durch die retrograde Perfusion die Besiedlung des thorakalen Abschnittes mit eher abdominal zuzuschreibenden Bakterien zu erklären. Um diese zu vermeiden

bzw. zu verringern, wäre die anschließende Lavage und Wechsel der Lagerlösung, wie bereits in Organkonservation in Lösungen etabliert ist, eine Option um die alleinige Bakterienanzahl zu minimieren.

5.2 Histologie/ Immunhistologie

5.2.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung

In der Auswertung der Aorta thoracalis zeigt sich keine Stromadegeneration und ebenfalls keine Zellkern Abblassung, weder in der Versuchsgruppe der direkten Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0), noch in der Gruppe nach direkter Entnahme und Lagerung über 3 Wochen in der Versuchslösung (AT 0/3). Wohingegen in der Gruppe nach einer verzögerten postmortalen Entnahme nach 36 Stunden sich bei allen Präparaten eine Stromadegeneration Grad 2 ergibt, unabhängig von der Lagerungsdauer in der Versuchslösung TiProtec®. Hier zeigten sich in allen Präparaten konfluierende Degenerationsherde. In Bezug auf die Zellkern Abblassung ergibt sich ein ähnliches Bild, dabei zeigen fast alle Präparate eine maximale Zellkern Abblassung Grad 1, also 10 % entsprechend.

Für den thorakalen Aortenabschnitt ergibt sich, dass der postmortale Entnahmezeitpunkt mit einhergehender warmer Lagerungszeit des Präparates in Hinblick auf die Stromadegeneration deutlich entscheidender zu sein scheint als die folgende Kaltlagerung. In der Gruppe der direkten Entnahme zeigt sich in Bezug auf eine Bindegewebsabschwächung bzw. einer zunehmenden Autolyse keine histopathologischen Auffälligkeiten. Nach 3-wöchiger Kaltlagerung lässt sich ebenfalls kaum ein Unterschied ausmachen.

Eine konklusive Aussage über die Funktionalität des Gefäßes kann hieraus nicht abgeleitet werden. Jedoch besteht bei weitgehend belassender Integrität der Bindegewebsstrukturen mit erhaltenen Zellkernstrukturen die Möglichkeit einer funktionalen Matrix des Präparates. Insbesondere, da bereits direkt postmortal entnomme Gefäße nach Kaltlagerung und anschließender Kryokonservation bereits im klinischen Alltag gute Ergebnisse zeigen.(9,45,46,49–54) In der patientennahen Praxis erfolgt zumeist eine Beurteilung der Präparate/ Allografts gemäß histologischer Beurteilung, welche nachempfunden wurde.

Eine standardisierte regelhafte pathologische Aufarbeitung von verwendeten Allograft Materialien ist bislang nicht etabliert, hierfür ist die Relevanz in Bezug auf eine klinische Umsetzung zu diskutieren.

Im abdominalen Abschnitt der Aorta ergibt sich ein vergleichbares Bild zum thorakalen Abschnitt. Die Gruppe der Präparate, welche direkt postmortal entnommen wurden, zeigen weder eine Stromadegeneration noch eine Zellkernabblassung. Dieses Ergebnis zeigt sich auch für die Präparate, welche nach einer direkten Entnahme weiter für 3 Wochen in der Versuchslösung kalt gelagert wurden.

Ein deutlich differenzierteres Bild ergibt sich für die Präparate, welche 36 Stunden postmortal entnommen wurden. Hierbei konnte bereits in der Gruppe der direkten Analyse nach Entnahme (AA 36/0) eine Stromadegeneration Grad 1 bzw. häufiger Grad 2 festgestellt werden. Die Zellkerne zeigen eine Abblassung Grad 1. Nach erfolgter Kaltlagerung und verzögerter postmortaler Entnahme ergibt sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild. Dabei sind Stromadegenerationen Grad 1 bis Grad 3 und Zellkern Abblassung Grad 0 bis 4 anzutreffen.

In Bezug auf die Zellkernabblassung und Bindegewebsdegeneration weisen die direkt entnommenen Präparate keinen histopathologische erkennbaren Veränderungen auf. Dies ist kongruent zu den thorakalen Aortenabschnitten derselben Gruppe.

Wiederum zeigt sich auch in dieser Gruppe eine weitere Verteilung der histopathologischen Befunde nach verzögerter postmortaler Entnahme.

Sowohl im abdominalen wie auch im thorakalen Abschnitt zeigen sich histopathologische Stroma Veränderungen und zunehmende Zellkernabblassung nach direkter postmortaler Entnahme der Gefäßpräparate. Diese stellen sich unverändert nach einer Kaltlagerung in der Versuchslösung über drei Wochen dar.

Jedoch ergibt sich ein deutliches heterogeneres Bild nach verzögerter postmortaler Entnahme. Hierbei scheinen zelluläre Prozesse der Warmlagerung postmortal einen größeren Einfluss auf die Bindegewebsstruktur und die Zellkerne zu zeigen. Die Frage der klinischen Relevanz bei nicht weiter geklärter Funktionalität der Gefäße bleibt offen. Dafür wären weitere, auf die Funktionalität ausgelegte Untersuchungen, wie sie bereits die Gruppe um T. Wille durchgeführt hatte, sicher wegweisend. (18,55)

5.2.2 Cluster of Differentiation 31 (CD31)

5.2.2.1 Aorta thoracalis

Die Auskleidung der entnommenen Gefäße mit Intima, welche durch die CD31 Färbung dargestellt wurde, zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der Direktentnahme und der verzögerten postmortalen Entnahme.

Bei direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0) zeigen fast alle Gefäße eine Intima-Auskleidung von 89% im Mittelwert, sodass von einer weitgehend korrekt anhaftenden Intima ausgegangen werden kann. Der gering prozentuale Verlust bei einem frischen Präparat sollte im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung und den damit verbundenen mechanischen Prozess der Einbettung diskutiert werden. Als weitere Ursache ist die postmortal durchgeführte Perfusion und dadurch entstehende Scherkräfte in Betracht zu ziehen. Bei direkter Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 0/3) zeigt sich eine Intima- Abdeckung von 69% (+/- 19%), was eine deutlich größere Streubreite der Präparate in der Gruppe darstellt. Eine Ablösung der Intima im Rahmen der Kaltlagerung ist somit wahrscheinlich, wenn auch über die Hälfte noch des Gefäßumfanges noch bedeckt ist.

Ein ähnliches Bild, wenn auch mit unterschiedlichen Ausgangswerten ergibt sich für die Gruppen der verzögerten postmortalen Entnahme. Nach verzögerter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 36/0) zeigt sich eine Bedeckung des Gefäßumfanges von 59% (+/- 22%). Es ist von einer reduzierten Adhärenz der Intima an die Gefäßwand auszugehen. Interessanter Weise ist dieses Ergebnis in einem ähnlichen Rahmen der direkten Entnahme mit Kaltlagerung (AT 0/3) entsprechend.

Für die verspätete postmortale Entnahme mit Kaltlagerung (AT 36/3) ist die Intima zu großen Teilen abgelöst.

Es zeigt sich über die Entnahmezeit bzw. Lagerungsdauer eine deutliche Abnahme der Bedeckung des Gefäßes mit Endothel, welches somit über beide Modulationspunkte, der Kaltlagerung und des Entnahmezeitpunktes, fragiler zu werden scheint.

Die einschichtige Intima scheint einen Adhäsionsverlust sowohl über die postmortale Lagerung wie auch über die Kaltlagerung zu haben. Als mögliche Auslöser sind sicher die Präparation, die Perfusion als auch die Autolyse anzuführen.

5.2.2.2 Aorta abdominalis

Für den abdominalen Aortenabschnitt ergibt sich eine ähnliche Aufteilung.

Die direkt entnommenen und nicht kalt gelagerten Gefäßpräparate (AA 0/0) zeigen sich mit einer hohen Anhaftungsrate der Intima an die Gefäße. Bereits nach Lagerung der

direkt entnommenen Gefäße über 3 Wochen in der Versuchslösung (AA 0/3) zeigt sich eine Abnahme der Intima Bedeckung auf 60% (+/- 15%). Dies ist kongruent zum thorakalen Abschnitt.

Mit verzögerter postmortaler Entnahme mit oder ohne Kaltlagerung in der Versuchslösung ergibt sich fast eine subtotale Ablösung der Intima vom Gefäßpräparate. Es scheinen, wie bereits für den thorakalen Abschnitt beschrieben, die Adhäsionen an die Media fast vollständig aufgelöst.

Zwischen dem thorakalen zu den abdominellen Abschnitten zeigt sich die Intima in der Gruppe der direkten Entnahme mit Kaltlagerung in vergleichbarer prozentualer Bedeckungen des Gefäßes.

Jedoch zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem thorakalen Aortenabschnitt und dem abdominalen Aortenabschnitt nach verzögerter postmortaler Entnahme mit und ohne Kaltlagerung. Dabei zeigt sich eine teilweise Abdeckung im thorakalen Abschnitt, wohingegen diese abdominell fast nicht vorhanden ist. Die Intima des abdominalen Abschnittes scheint fragiler auf äußere Einflussfaktoren zu reagieren.

Eine mögliche Erklärung hierzu ist der formstabile thorakaler Aortenabschnitt, wohingegen sich abdominell im eher muskulär geprägten Anteil ein Verlust der rundlichen Form darstellt. Die Intima scheint eine höhere Adhärenz zur thorakalen, bindegewebigen Abschnitten zu haben.

Weiterhin ist eine akzidentelle Ablösung im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung möglich, jedoch sprechen intakte Intima Abdeckungen in der Kontrollgruppe der direkten Entnahme ohne weitere Kaltlagerung dagegen.

Also lassen sich aufgrund der vorliegenden Daten keine Aussagen bezüglich der Funktionsfähigkeit der Intima und der möglichen Neointimabildung ableiten. Jedoch ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung die Rolle der Neointima (56–58). Es wird eine Migration durch die Prothese bzw. das Homograft diskutiert, gleich wie der Einfluss vorhandener Intima. Somit bleibt weiter zu klären, welchen Einfluss eine bereits vorhandene Intima für die Implantation und den weiteren Heilungsverlauf hat.

Durch Song et al. wurde eine Reduktion der Bildung einer Neointima im Rattenmodell durch die Zugabe von Kohlenmonoxid freisetzende Moleküle beschrieben, woraus ein geringerer Endothelschaden entstand. (59)Die intrazellulären Ionenverschiebungen bzw. der oxydative Stress der Zelle, welche im Rahmen der Kaltlagerung eintritt, scheint einen großen Einfluss auf das Transplantatversagen bzw. den Aufbau einer Neointima zu haben. Dies ist bereits aus den soliden Organtransplantationen untersucht ((59,60)

5.2.3 Smooth Muscle Actin Alpha (SMA alpha)

5.2.3.1 Aorta thoracalis

Das Muskelprotein SMA alpha zeigt im Vergleich der Zeitpunkte der direkten Entnahme ohne Kalltlagerung (AT 0/0) zur Gruppe mit nachfolgender Kalltlagerung (AT 0/3) nur einen geringen Verlust der Fluoreszenzintensität. Nach verzögerter postmortaler Entnahme (AT 36/0) stellt sich eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit dar, wobei diese unter Betracht der Standardabweichungen vergleichbar scheint. Ein spannender Aspekt ist sicherlich, dass auch nach verzögerter Entnahme mit folgender Kalltlagerung (AT 36/3) sich eine gleichbleibende Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit abbilden lässt.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung lässt sich jedoch keine Aussage hinsichtlich der Funktionalität der Media treffen. Ob es sich in der gemessenen Fluoreszenzintensität pro Fläche um nachweisbares, intaktes, funktionsfähiges Muskelprotein handelt, oder ob dies nicht funktionstüchtige Abbauprodukte der Muskulatur sind, und somit eine falsch positive Färbung darstellen, lässt sich nicht erkennen.

Des Weiteren könnte durch eine bereits beginnende Autolyse und Auflockerung der Protein- und Zellstrukturen sich eine größere Ansatzfläche für die Antikörper in der Färbung ergeben. Eine Erhöhung der anzufärbenden Fläche wäre somit denkbar.

5.2.3.2 Aorta abdominalis

Im abdominellen Abschnitt zeigt sich ein gleichbleibendes Bild zum vorbekannten thorakalen Abschnitt. Die absoluten Werte der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit sind gegenüber dem thorakalen Abschnitt erhöht, was sich auf den vermehrten muskulären Anteil im abdominellen Abschnitt in der Media zurückführen lässt.

Kongruent zum thorakalen Abschnitt zeigt sich ein weitgehend homogenes Bild, ohne relevanten Verlust der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit, weder für den Entnahmezeitpunkt noch für die Lagerungsdauer.

Auch bleibt die Funktionalität der vorliegenden Media zu klären, da wie bereits im thorakalen Abschnitt erwähnt, eine mögliche falsch positive Färbung im Rahmen von Strangbrüchen der Muskulatur möglich scheint.

Es ergibt sich somit weder für den thorakalen noch für den abdominellen Anteil ein relevanter Verlust der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit. Dieser zeigt sich ebenfalls nicht über die Kalltlagerungszeit noch über den verspäteten Entnahmezeitpunkt. Hinsichtlich der Funktionalität lässt sich keine Aussage treffen,

jedoch könnte diese im Rahmen der gleichbleibenden Intensität der Präparate über Entnahmezeit und Lagerungsdauer vorhanden sein.

In beiden Gruppen zeigt sich somit kein relevanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Insgesamt lässt sich eine deutliche vermehrte Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit in der abdominellen Gefäßauswertung ausmachen, welche am ehesten in Zusammenhang mit der vermehrten muskulären Histologie des Gefäßabschnittes zu werten ist.

5.2.4 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

5.2.4.1 Aorta thoracalis

Die Auswertung der Fluoreszenz-Darstellung der Zellkerne zeigt für den thorakalen Abschnitt ein weitgehend homogenes Bild.

Die gefundene Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen im Verlauf der Lagerungsdauer der Präparate könnte aufgrund der Apoptose zustande kommen, jedoch lässt sich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität auch durch eine mögliche Nekrose der Zelle, bzw. ein Auflösen des Zellverbandes entstehen. Etwa durch die Denaturierung lässt sich eine Verminderung der Anfärbbarkeit der Zellkerne erklären. Kleinere DNA-Fragmente lassen sich zwar noch anfärben, zeigen aber nicht dieselbe Intensität.

Weiterhin besteht die Möglichkeit aufgrund der zunehmenden Standardabweichung in der Gruppe der direkten Entnahme mit direkter Weiterverarbeitung (AT 0/0), eine höhere Heterogenität der Zellkerne im Rahmen des normalen Zellzyklus vorzufinden. Hieraus kann sich ebenfalls eine Erweiterung der Spannweite der Fluoreszenzintensität ergeben. Die Standardabweichung scheint in den Gruppen der verlängerten Kaltlagerung (AT 0/3 und AT 36/3) geringer auszufallen. Dies könnte durch eine Reduktion der Anzahl der Zellzyklen und damit der Möglichkeit der Anfärbbarkeit der Zellen erklärt werden, da weniger Anlagerungsfläche des DAPI an die DNA-Fragmente möglich ist. (61)

Ebenfalls zeigt sich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit nach Kaltlagerung, welche sich bei direkter (AT 0/0) bzw. verzögerter postmortaler Entnahme (AT 36/0) ohne folgender Kaltlagerung nicht darstellen lässt.

Aus den genannten Befunden könnte sich schließen lassen, dass es teilweise zu einer Zellzahlabnahme kommt. Beides zeigt sich erst nach verlängerter Kaltlagerung, sodass die Möglichkeit eines protektiven Effektes der Kaltlagerung in Bezug auf die Zellumsatzaktivität diskutiert werden kann. In der Auswertung zeigt sich die Abnahme der Fluoreszenzintensität in beiden Versuchsgruppen nach direkter bzw. verzögerter Entnahme mit Dauer der Kaltlagerung. Jedoch könnte dies auch für den Verlust an DNA-Fragmenten bedeuten. Ein funktioneller Nachweis des Zellzyklus lässt sich nicht erbringen, weitere Zellzyklus spezifische Untersuchungen wären zur Klärung sicher empfehlenswert. Insbesondere vor dem Hintergrund der oben angeführt und unten diskutierten Ergebnisse der TUNEL Färbung.

Ein relevanter Verlust der Fluoreszenzintensität über die verzögerte Entnahme bzw. die Kaltlagerung der Gefäßabschnitte ist somit nicht ausmachbar. Es zeigen sich in allen Gruppen hohe Standardabweichungen.

5.2.4.2 Aorta abdominalis

In der Auswertung der Fluoreszenzintensität der abdominalen Aortenabschnitte zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen der direkten Entnahme mit (AA 0/3) oder ohne (AA 0/0) Kaltlagerung zu verzögert postmortal entnommenen Gefäßen, unabhängig von der Kaltlagerung.

In den Gruppen der direkten Entnahme ohne Kaltlagerung (AA 0/0) zeigt sich im Vergleich zur Gruppe der direkten Entnahme mit Kaltlagerung (AA 0/3) keine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Mittel, mit vergleichbaren Standardabweichungen. Somit ist ebenfalls eine vermehrte Anfärbbarkeit der DNA durch zunehmende DNA-Strangbrüche im Rahmen des Zellbaues zu diskutieren. Jedoch könnte dies auch für ein Bestehen der Zellen und ihres Zellzyklus sprechen.

Für die Gruppen der verzögerten postmortalen Entnahme ohne (AA 36/0) bzw. mit folgender Kaltlagerung (AA 36/3) ergibt sich ebenfalls ein weitgehend homogenes Bild. Beide Gruppen weisen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität gegenüber den Gruppen der Direktentnahme auf, welche sich jedoch über die Dauer der Kaltlagerung weitgehend nicht verändert.

Es scheint sich ein relevanter Verlust der Fluoreszenzintensität durch die postmortale Lagerung zu ergeben, und weniger durch die folgende Kaltlagerung.

Hierbei könnte eher die Apoptose bzw. Nekrose im Rahmen der warmen postmortalen Lagerung eine Rolle spielen, welche sich bei direkter Entnahme und folgender Kaltlagerung nicht entsprechend ausgeprägt darstellt.

In Zusammenschau des thorakalen versus abdominalen Abschnittes zeigt sich somit ein deutlicher Unterschied der anatomischen Abschnitte. Es ergibt sich eine gleichbleibende hohe Standardabweichung der Fluoreszenzintensität pro Fläche nach direkter Entnahme und Aufarbeitung sowie nach direkter Entnahme mit Kaltlagerung. Wohingegen dies im thorakalen Abschnitt sich auch nach verzögerter postmortaler Entnahme eine nahezu gleichbleibende Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit darstellen lässt, zeigt sich im abdominalen Abschnitt eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität nach direkter Entnahme im Vergleich zur verzögerten postmortalen Entnahme.

Insgesamt betrachtet ist die Fluoreszenzintensität des abdominellen Abschnittes deutlich höher als die des thorakalen Abschnittes. Hierdurch kann die Abnahme der Fluoreszenzintensität auch deutlicher zur Darstellung kommen, da ebenfalls die Standardabweichungen geringer sind als im thorakalen Abschnitt.

Zur Diskussion dieses Effektes entsteht eine vermehrte Aktivität der Zellkerne des abdominellen versus den thorakalen Abschnitt, jedoch kann dies auch durch eine bereits fortgeschrittene apoptotische Situation der Zellen zu erklären sein. Ebenfalls kann es sich um bereits nekrotische Zellen bzw. Zellmaterial handeln, welches falsch positiv zur Darstellung kommt.

Insgesamt zeigt sich eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit des abdominellen Abschnittes im Gegensatz zum thorakalen Aortenabschnitt. Ein Unterschied lässt sich aufgrund der anatomischen und histologischen Unterschiede der Gefäßabschnitte darstellen, da die abdominellen Gefäßpräparate aus mehr muskulären Zellen und weniger kollagenen Fasern bestehen. Zudem sind die Durchmesser der Aortenabschnitte variant, der thorakale Abschnitt stellt sich, wie in den oben aufgeführten Abbildungen, deutlich grösser dar. Eine Verdichtung der Fluoreszenzintensität kann sicher nicht in direkter Korrelation zu den vorhandenen Zellzahlen gesehen werden.

Hinsichtlich der Funktion der entnommenen Gefäßabschnitte sind nur Hypothesen möglich. Bei gleichbleibenden Zellzahlen könnte eine bessere Einsatzfähigkeit des thorakalen Abschnittes gegeben sein. Jedoch ist bei möglichem Erhalt der Muskulatur in der Tunica media gegebenenfalls auch von einer höheren physiologischen Funktion auszugehen.

Um diese Frage abschließend zu klären, müssten weitere, der Funktion zugewandte, Experimente angefügt werden, wie sie zum Beispiel in der Evaluation der Lagerlösung TiProtec® durch Garbe et al (21) durchgeführt wurden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich der postmortale Entnahmezeitpunkt im abdominellen Abschnitt deutlicher auf die Fluoreszenzintensität auswirkt, als es für den thorakale Abschnitt nachweisbar ist. Dies wird, wie bereits erwähnt, am ehesten mit dem histologischen Aufbau der beiden Gefäßabschnitten in Zusammenhang stehen. Im abdominalen Anteil, mit einer höheren zellulären Dichte scheint die Abnahme der Anfärbung deutlicher festzustellen zu sein.

5.2.5 Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

5.2.5.1 Aorta thoracalis

Für den thorakalen Abschnitt zeigt sich bei direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AT 0/0) kein Nachweis von TUNEL positiven Zellen. Somit kann diese Färbung mit der zugehörigen Isotopenprobe als Negativprobe angesehen werden.

Über die Lagerungszeit lässt sich nach direkter Entnahme und folgender Kaltlagerung (AT 0/3) eine deutliche Zunahme von TUNEL positiven Zellen in allen Gefäßschichten- jedoch insbesondere in der Intima und Adventitia beobachten. Es zeigen sich vereinzelt bis reichlich TUNEL positive Zellen, sodass möglicherweise ein koordinierter, anaerober Zellzyklus bzw. Apoptose vorliegen könnte, jedoch kann eine Unterscheidung hinsichtlich nekrotischer bzw. bereits fragmentierter und destrukturierter DNA-Abschnitte durch die vorliegende Methodik nicht unterschieden werden.

Die vermehrte Zunahme der TUNEL positiven Zellen der Intima bzw. Adventitia könnte durch den Umstand der vermehrten Kollagenen Fasern in der Media der thorakalen Aorta erklärt werden. Hierbei ist die Zelldichte in einer muskulären bzw. bindegewebigen Schicht geringer, sodass es zu weniger Anfärbung kommen kann.

Nach verzögerter postmortaler Entnahme und direkter histopathologischer Aufarbeitung (AT 36/0) ergibt sich für die Intima sowie die Media kein Nachweis von TUNEL positiven Zellen, jedoch zeigt sich ein Nachweis von vier vereinzelt TUNEL positiven Präparaten in der Adventitia. Es ergibt sich somit im Vergleich zu den Präparaten der direkt entnommenen und nicht kalt gelagerten Gefäße eine Zunahme an möglichen apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen in der Adventitia.

Nach verzögerter postmortaler Entnahme mit folgender Kaltlagerung (AT 36/3) finden sich TUNEL positive Zellen in allen Gefäßschichten, insbesondere wieder in der Adventitia, in der alle Präparate von TUNEL positive Zellen aufweisen und in der Media und Intima, wobei von vereinzelt bis mittel viele TUNEL positive Zellen hervortreten.

In Zusammenschau aller thorakaler Präparat Gruppen ergibt sich die Zunahme von TUNEL positiv gefärbten Zellen insbesondere in der Adventitia, sowie eine deutliche Zunahme über die Lagerungszeit in der Versuchslösung TiProtec®. Eine falsch positive Färbung durch bestehende DNA-Strangbrüche, welche im Rahmen der Degeneration auch auftreten können, ist nicht auszuschließen.(62,63) In Bezug auf die Funktionalität bzw. die Frage nach der Genese der positiven Färbung im Sinne einer Nekrose bzw. Apoptose kann mit den vorliegenden Färbungen nicht klar beantwortet werden. (64)

Hierzu wären weitere Färbungen bzw. Darstellungen des Zellzyklus notwendig, welche durch die TUNEL Färbung nicht gegeben ist. Durch Mirayans et al wurde im Jahre 2020 gezeigt, dass eine Überleitung von bereits in Apoptose befindlichen Zellen in einen normalen Zellzyklus möglich ist, welcher sich Anastasis nennt. Es werden somit fälschlicherweise positive TUNEL Zellen als nicht mehr funktionell beteiligt bzw. apoptotisch angesehen, während sie wieder an einem normalen Zellzyklus teilnehmen könnten. (62–66)

5.2.5.2 Aorta abdominalis

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich für den abdominalen Abschnitt bei direkter Entnahme ohne Kaltlagerung (AA 0/0) kein Nachweis von TUNEL positiven Zellen. Über die Kaltlagerung ergibt sich eine Zunahme an TUNEL positiven Zellen insbesondere in der Intima bzw. Adventitia (AA 0/3), welche möglicherweise durch die zunehmende Apoptose im Rahmen der Kaltlagerung zu sehen ist.

Nach der verzögerten postmortalen Entnahme (AA 36/0) zeigen sich vermehrt TUNEL positive Zellen in der Adventitia und etwas vermindert in der Media, welche über die Dauer der Kaltlagerung (AA 36/3) eine weitere Auffächerung in Zunahme der Anzahl der positiven Zellen ergibt. Es zeigen sich erstmals auch reichlich TUNEL positive Präparate, was mit einer vermehrten Induktion der Apoptose einhergehen könnte bzw. mit dem zunehmenden Verlust des Zellverbandes.

Auch ist eine Unterscheidung hinsichtlich apoptotischer Zellen hin zu nekrotischen Zellen nicht möglich, ebenfalls ist eine positive Färbung bei vermehrten DNA-Strangbrüchen möglich. Diese Differenzierung lässt sich durch den TUNEL Assay nicht detektieren.

In beiden Aortenabschnitte zeigen sich häufiger TUNEL positive Zellen im Bereich der Adventitia, welche insbesondere in den Randbereichen der Gefäße wieder zu finden sind, womit eine Färbung von anliegendem lymphatischem Gewebe bzw. der Vasa vasorum möglich ist.

Sowohl in der thorakalen als auch in der abdominalen Aorta lassen sich keine TUNEL positive Nachweise in der Gruppe der direkten Entnahme und direkter Aufarbeitung nachweisen. Bei verzögerter postmortaler Entnahme zeigt sich für beide Abschnitte in der Intima keine TUNEL positiven Zellen. Über die Zeit der Kaltlagerungen nehmen die TUNEL positiven Zellen in allen Gefäßschichten zu.

Wie bereits für die oben beschriebenen Abschnitte erwähnt, lassen sich durch die aufgeführten Ergebnisse keine Aussagen über Funktionalität bzw. den realen Zellzyklus treffen, dies sollte durch weiterführende Untersuchungen zu klären sein.

5.3 Kaltlagerung in TiProtec®

In der aktuellen Literatur zeigt sich eine verbesserte Funktionalität und ein verbesserter Erhalt der Gefäßstruktur nach Lagerung der Gefäßabschnitte in TiProtec®. (67,68) Veres et al. zeigten, dass zur Transplantation vorgesehene Aortenabschnitten in Ratten eine verbesserte Funktion und Endothelbedeckung aufweisen nach Verwahrung in TiProtec® und warmer Reperfusion vor der Implantation. (68)

Im Jahr 2023 publizierte Layton et al. ein Review über die zur Anwendung kommenden Lagerungslösungen für venöse Interponaten im Rahmen von kardiovaskulären Eingriffen. Es konnten 13 Publikationen mit insgesamt acht Versuchslösungen eingeschlossen werden. Es ergab sich eine verbesserte venöse endotheliale Integrität, welche als Indikator für eine Endotheliale Hyperplasie bzw. die Offenheitsrate der venösen Bypässe angesehen wird, für die Lagerungslösungen TiProtec® und DuraGraft®. (67)

Die vermehrte Einsatz von TiProtec® wird in den kommenden Jahren nach Vorliegen von Langzeitdaten nochmals neu zu evaluieren sein, in der aktuell vorliegenden Literatur scheint sich ein Vorteil der Lösung gegenüber den bisher verwendeten Lagerungslösungen abzuzeichnen.

6 Zusammenfassung

6.1 Beantwortung der aufgeworfenen Fragen

1. Besteht eine Veränderung der histologischen Struktur der Gefäße bei unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten mit Kaltlagerung?

In der vorliegenden Ausführung lässt sich eine Veränderung der Gefäßstruktur in den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten mit und ohne folgender Kaltlagerung feststellen. Nach direkter Entnahme ergibt sich für den thorakalen Abschnitt eine hohe Konsistenz der Proben mit und ohne Kaltlagerung. Nach verzögerter postmortaler Aorten Entnahme bleibt die Zellkernabblassung bzw. die Stromadegeneration auch über die Kaltlagerungsdauer bestehen. Für den abdominalen Abschnitt zeigt sich ebenfalls eine hohe interne Konsistenz der Proben bei direkter Entnahme mit und ohne Kaltlagerung, diese entsprechend dem thorakalen Abschnitt. Für die verzögerte Entnahme ergibt sich jedoch eine Auffächerung der Stromadegeneration.

Jedoch ergibt sich über die Lagerungsdauer und insb. nach verzögerter postmortaler Aorten Entnahme ein Verlust der Intima, dies sowohl im abdominalen wie auch im thorakalen Abschnitt. In Bezug auf die muskuläre Media lassen sich keine wesentlichen Unterschiede bzgl. des Entnahmezeitpunktes bzw. der Lagerungsdauer feststellen. Die Abnahme der Färbungsintensität der Zellekerne mit einer Verminderung der Streubreite spricht für eine Zellkerndegeneration über die postmortale warme Lagerung bzw. die folgende Kaltlagerung.

2. Wie verhalten sich die Gefäßabschnitte hinsichtlich der Apoptose bzw. Nekrose?

Der abdominale Abschnitt zeigt einen höheren Anteil an apoptotischen Zellen, beide Gefäßabschnitte zeigen eine Zunahme über die warme Lagerungsdauer postmortal sowie über die folgende Kaltlagerung. Dass hierbei noch TUNEL positive Zellen sich darstellen lassen, könnte einen geordneten Zellzyklus und hiermit einhergehend eine funktionsfähige Zelle beschreiben.

Ein relevanter nekrotischer Gefäßanteil konnte in den HE-Färbung in keiner Gruppe ausgemacht werden.

3. Bestehen Unterschiede in den thorakalen bzw. abdominalen Aortenabschnitten?

Es zeigen sich in fast allen Untersuchungen deutliche Unterschiede im den beiden Aortenabschnitten, welche am ehesten aufgrund des unterschiedlichen histologischen Aufbaues bzw. der entsprechenden anatomischen Lage zu erklären sind. Hierbei zeigt sich die thorakale Aorta stabiler aufgrund des kollagenen Gerüsts, wohingegen der abdominelle Abschnitt mit mehr Zellen durch die vermehrten muskulären Zellen aufwartet.

Dies bedingt möglicherweise auch die höhere Intima Adhärenz an den thorakalen Aortenabschnitt, wohingegen der muskuläre Anteil des abdominellen Abschnittes mehr funktionsfähige Zellen aufweisen könnte.

Die bakterielle Besiedlung ist in Intensität und Anzahl für den abdominellen Abschnitt erhöht, wobei hier die direkte Bezugslage zum Intestinum im Rahmen der warmen Lagerung zu bedenken ist.

4. Welche bakterielle beziehungsweise fungale Besiedlung besteht nach postmortalen Entnahme und unterscheidet sich diese zur direkten Entnahme bzw. in den Aortenabschnitten?

Eine fungale Besiedlung konnte nicht festgestellt werden, jedoch eine unterschiedlich ausgeprägte bakterielle Besiedlung der Proben. Mit vorliegender verzögerter postmortaler Aorten Entnahme steigt die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten und die Anzahl der mehrfachen Besiedlung einer Probe. Hierbei zeigt sich eine geringe Zunahme für den abdominellen Abschnitt gegenüber dem thorakalen Aorten Anteil. In der Auswertung der Bakterienspezies zeigen sich vermehrt Bakterien Species, die der Haut bzw. Darmflora zugeordnet werden können. Über den Zeitraum der Lagerung in kalter Lösung gibt es eine Zunahme von anaeroben Species. Diese Beobachtung ist für den abdominellen wie auch den thorakalen Abschnitt zu dokumentieren.

6.2 Zusammenfassung in Deutsch

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse zeigt sich, dass die Aortenabschnitte unterschiedlich auf die verzögerte postmortale Entnahme reagieren.

Die histologische Struktur der Gefäßabschnitte scheint weniger durch die Kaltlagerung als mehrheitlich durch die verzögerte postmortale Entnahme bestimmt zu sein. Im Hinblick auf Nekrosen bzw. Apoptose der Gefäßabschnitte zeigte sich kein Nachweis relevant großen Nekrose Areale in der HE-Färbung. Die Anzahl der TUNEL positiven Zellen steigt mit Dauer der Kaltlagerung und mit verzögerter Entnahme, jedoch kann keine Aussage zur Funktionalität der Zellen erfolgen.

Eine bakterielle Besiedlung zumeist der Haut- bzw. Darmflora zuzuordnen, ist insb. nach Kaltlagerung und verzögerter postmortaler Entnahme nachzuweisen. Im Wissen dessen, wäre eine entsprechend angepasste mikrobielle Therapie sicher möglich.

Die postmortal entnommenen Gefäßabschnitte mit entsprechender Lagerung können daher als Gefäßmatrix dienen. Zur weiteren Prüfung der Funktionalität sind folgende funktionelle Untersuchungen sicher notwendig. Eine postmortale Spende ist weiter zu verfolgen, insb. bei abnehmenden Gewebe- bzw. Organspenderzahlen und erhöhtem Bedarf.

6.3 Conclusion in English

A synopsis of the present results shows that the aortic sections respond differently to delayed postmortem retrieval.

The histological structure of the vessel sections seems to be determined less by the cold storage and more by the delayed postmortem retrieval. Regarding necrosis or apoptosis of the vessel sections, there was no evidence of relevant large necrosis areas in HE staining. The number of TUNEL positive cells increased with duration of cold storage and with delayed collection, but no statement on the functionality of the cells can be made.

Bacterial colonization, mostly of the skin or intestinal flora, can be detected especially after cold storage and delayed postmortem sampling. In the knowledge of this, a correspondingly adapted microbial therapy would certainly be possible. Therefore, the postmortem harvested vascular sections with appropriate storage can serve as vascular matrix. For further testing of functionality, the following functional examinations are certainly necessary. Post-mortem donation should be further pursued, especially in case of decreasing tissue or organ donor numbers and increased demand.

7 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

ABBILDUNG 1 - SCHEMATISCHER AUFBAU EINER GEFÄßWAND (ANATOMY OVERVIEW OF A HUMAN ARTERY- GEZEICHNET FÜR EINE DOKTORARBEIT. MAASTRICHT, NOVEMBER 2005. STIJN A.I. GHESQUIERE) (25).....	13
ABBILDUNG 2- PRÄPARATION DER THORAKALEN AORTA (STERNMARKIERUNG).....	18
ABBILDUNG 3- PRÄPARATION DER ABDOMINALEN AORTA (STERNMARKIERUNG)	18
ABBILDUNG 4- ABDOMINO- THORAKALES GEFÄß PRÄPARAT	19
ABBILDUNG 5- BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN TRIPLEFÄRBUNG MIT DAPI IN BLAU (LINKS OBEN), SMA ALPHA IN GRÜN (RECHTS OBEN), CD31 IN ROT (LINKS UNTEN) UND IN KOMBINATIONSBETRACHTUNG (RECHTS UNTEN) - VERSUCHSGRUPPE AORTA THORACALIS DIREKTE ENTNAHME OHNE LAGERUNG. (AT 0/0)	27
ABBILDUNG 6- BEISPIELDARSTELLUNG DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA ABDOMINALIS MIT VERZÖGERTER ENTNAHME UND FOLGENDER KALTLAGERUNG (AA 36/3)	29
ABBILDUNG 7- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES THORAKALEN ABSCHNITTES NACH DIREKTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AT: AORTA THORACALIS)	32
ABBILDUNG 8- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES THORAKALEN ABSCHNITTES NACH VERZÖGERTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AT: AORTA THORACALIS)	32
ABBILDUNG 9- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES THORAKALEN ABSCHNITTES NACH DIREKTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AT: AORTA THORACALIS)	33
ABBILDUNG 10- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES THORAKALEN ABSCHNITTES NACH DIREKTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AT: AORTA THORACALIS)	34
ABBILDUNG 11- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES ABDOMINALEN ABSCHNITTES NACH DIREKTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AA: AORTA ABDOMINALIS).....	35
ABBILDUNG 12- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES ABDOMINALEN ABSCHNITTES NACH VERZÖGERTER ENTNAHME (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AA: AORTA ABDOMINALIS).....	35
ABBILDUNG 13- QUANTITATIVE ANZAHL AN KBE PRO VERSUCHSGRUPPE DES THORAKALEN ABSCHNITTES NACH DIREKTER ENTNAHME- ANZAHL DER MAXIMALEN KBE PRO VERSUCHSTIER (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AA: AORTA ABDOMINALIS)	36
ABBILDUNG 14- ANZAHL DER MAXIMALEN KOLONIEN BILDENDEN EINHEITEN (KBE) PRO VERSUCHSTIER (INSG. 10) FÜR DEN ABDOMINALEN AORTENABSCHNITT VERZÖGERTE POSTMORTALE ENTNAHME UND KEINE BZW. 3 WOCHEN KALTLAGERUNG (KBE: KOLONIEN BILDENDE EINHEITEN; AA: AORTA ABDOMINALIS)	36
ABBILDUNG 15- GRAD DER STROMADEGENERATION DER AORTA THORACALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG	44

ABBILDUNG 16- GRAD DER ZELLKERNABBLASSUNG DER AORTA THORACALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG	45
ABBILDUNG 17 - GRAD DER STROMADEGENERATION UND ZELLKERN ABBLASSUNG DER AORTA THORACALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER VERZÖGERTEN POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG.	45
ABBILDUNG 18- GRAD DER ZELLKERNABBLASSUNG DER AORTA THORACALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER VERZÖGERTEN POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG	46
ABBILDUNG 19- GRAD DER STROMADEGENERATION DER AORTA ABDOMINALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTE POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG...	47
ABBILDUNG 20- GRAD DER ZELLKERNABBLASSUNG DER AORTA ABDOMINALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTE POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG...	47
ABBILDUNG 21- GRAD DER STROMADEGENERATION DER AORTA ABDOMINALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTE POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG...	48
ABBILDUNG 22- GRAD DER ZELLKERNABBLASSUNG DER AORTA ABDOMINALIS FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE DER DIREKTE POSTMORTALEN ENTNAHME MIT UND OHNE KALTLAGERUNG...	48
ABBILDUNG 23- PROZENTUALE BEDECKUNG DER AORTA THORACALIS MIT CD 31 (INTIMA).....	49
ABBILDUNG 24- PROZENTUALE BEDECKUNG DER AORTA THORACALIS MIT CD 31 (INTIMA) IN BOXPLOT DARSTELLUNG	50
ABBILDUNG 25- PROZENTUALE BEDECKUNG DER AORTA ABDOMINALIS MIT CD 31 (INTIMA)	51
ABBILDUNG 26- PROZENTUALE BEDECKUNG DER AORTA ABDOMINALIS MIT CD 31 (INTIMA) IN BOXPLOT DARSTELLUNG	52
ABBILDUNG 27- PROZENTUALE BEDECKUNG DER AORTA THORACALIS UND AORTA ABDOMINALIS MIT CD 31 (INTIMA) IN GEGENÜBERSTELLUNG	52
ABBILDUNG 28 - INTENSITÄT DER SMA ALPHA FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS.....	53
ABBILDUNG 29- INTENSITÄT DER SMA ALPHA FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS IN BOXPLOT DARSTELLUNG	54
ABBILDUNG 30 - INTENSITÄT DER SMA ALPHA FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA ABDOMINALIS	55
ABBILDUNG 31- INTENSITÄT DER SMA ALPHA FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA ABDOMINALIS IN BOXPLOT DARSTELLUNG	55
ABBILDUNG 32- INTENSITÄT DER SMA ALPHA FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS UND AORTA ABDOMINALIS IN GEGENÜBERSTELLUNG	56
ABBILDUNG 33- INTENSITÄT DER DAPI-FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS.....	57
ABBILDUNG 34- INTENSITÄT DER DAPI-FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS IN BOXPLOT DARSTELLUNG	58
ABBILDUNG 35- INTENSITÄT DER DAPI-FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA ABDOMINALIS	59
ABBILDUNG 36- INTENSITÄT DER DAPI-FLUORESZENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA ABDOMINALIS	59

ABBILDUNG 37- INTENSITÄT DER DAPI-FLUORESCENZ (IN INTENSITÄT/ FLÄCHE) DER AORTA THORACALIS UND AORTA ABDOMINALIS IN GEGENÜBERSTELLUNG	60
ABBILDUNG 38-.....	61
ABBILDUNG 39- AORTA THORACALIS (OBEN) UND AORTA ABDOMINALIS (UNTEN) NACH DIREKTER ENTNAHME OHNE KALTLAGERUNG (AT 0/0, AA 0/0).....	61
ABBILDUNG 40- AORTA THORACALIS (OBEN) UND AORTA ABDOMINALIS (UNTEN) NACH VERZÖGERTER ENTNAHME OHNE KALTLAGERUNG (AT 36/0, AA 36/0).....	62
ABBILDUNG 41- AORTA THORACALIS (OBEN) UND AORTA ABDOMINALIS (UNTEN) NACH DIREKTER ENTNAHME OHNE KALTLAGERUNG (AT 0/3, AA 0/3).....	63
ABBILDUNG 42- AORTA THORACALIS (OBEN) UND AORTA ABDOMINALIS (UNTEN) NACH DIREKTER ENTNAHME OHNE KALTLAGERUNG (AT 36/3, AA 36/3).....	64
ABBILDUNG 43/ ABBILDUNG 44- ANZAHL DER PROBEN MIT TUNEL POSITIVEN ZELLEN DER AORTA THORACALIS NACH DIREKTER ENTNAHME MIT UND OHNE FOLGENDER KALTLAGERUNG (AT 0/0) UND (AT 0/3)	65
ABBILDUNG 45 DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA THORACALIS DIREKTE ENTNAHME OHNE KALTLAGERUNG (AT 0/0).....	65
ABBILDUNG 46 DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA THORACALIS DIREKTE ENTNAHME MIT FOLGENDER KALTLAGERUNG (AT 0/3).....	66
ABBILDUNG 47/ ABBILDUNG 48 ANZAHL DER PROBEN MIT TUNEL POSITIVEN ZELLEN DER AORTA THORACALIS NACH VERZÖGERTER POSTMORTALER ENTNAHME MIT UND OHNE FOLGENDER KALTLAGERUNG (AT 36/0) UND (AT 36/3).....	66
ABBILDUNG 49- DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA THORACALIS VERZÖGERTE ENTNAHME OHNE FOLGENDE KALTLAGERUNG (AT 36/0).....	67
ABBILDUNG 50 - DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA THORACALIS VERZÖGERTE ENTNAHME MIT FOLGENDER KALTLAGERUNG (AT 36/3).....	67
ABBILDUNG 51/ ABBILDUNG 52- ANZAHL DER PROBEN MIT TUNEL POSITIVEN ZELLEN DER AORTA ABDOMINALIS NACH DIREKTER POSTMORTALER ENTNAHME MIT UND OHNE FOLGENDER KALTLAGERUNG (AA 0/0) UND (AA 0/3).....	68
ABBILDUNG 53- DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA ABDOMINALIS DIREKTE ENTNAHME OHNE FOLGENDE KALTLAGERUNG (AA 0/0)	68
ABBILDUNG 54- DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA ABDOMINALIS DIREKTE ENTNAHME UND FOLGENDER KALTLAGERUNG (AA 0/3)	68
ABBILDUNG 55/ ABBILDUNG 56- ANZAHL DER PROBEN MIT TUNEL POSITIVEN ZELLEN DER AORTA ABDOMINALIS NACH DIREKTER POSTMORTALER ENTNAHME MIT UND OHNE FOLGENDER KALTLAGERUNG (AA 36/0) UND (AA 36/3).....	69

ABBILDUNG 57- DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA ABDOMINALIS VERZÖGERTE ENTNAHME OHNE FOLGENDE KALTLAGERUNG (AA 36/0)	70
ABBILDUNG 58- DOPPELFÄRBUNG TUNEL POSITIVE ZELLEN IN GRÜN (LINKS) UND DAPI IN BLAU IN KOMBINATION (RECHTS)- AORTA ABDOMINALIS VERZÖGERTE ENTNAHME UND FOLGENDER KALTLAGERUNG (AA 36/3)	70
TABELLE 1- ÜBERSICHT DER VERSUCHSGRUPPEN, ANZAHL VERSUCHSTIERE (HAUSMAUS/ MUS MUSCULUS), DIFFERENZIERUNG NACH ENTNAHMEZEITPUNKTEN UND KALTLAGERUNGSDAUER ...	15
TABELLE 2- NOMENKLATUR VERSUCHSGRUPPEN	16
TABELLE 3- QUANTITATIVE EINTEILUNG DER KOLONIEN BILDENDEN EINHEITEN (KBE).....	21
TABELLE 4- QUANTITATIVE MIKROSKOPISCHE EINTEILUNG DER STROMADEGENARATION IN DER KONVENTIONELLEN HISTOLOGISCHEN AUFARBEITUNG	25
TABELLE 5- QUANTITATIVE MIKROSKOPISCHE EINTEILUNG DER ZELLKERNABBLASSUNG IN DER KONVENTIONELLEN HISTOLOGISCHEN AUFARBEITUNG	25
TABELLE 6- AUSWERTUNGSTABELLE TUNEL POSITIVER ZELLEN	30
TABELLE 7- GESAMTÜBERSICHT BAKTERIENSPECIES MIT PROZENTUALEM ANTEIL AN ALLEN KOLONIEN BILDENDEN EINHEITEN	38
TABELLE 8- BAKTERIENSPECIES MIT MERKMALEN FÜR DEN THORAKALEN AORTENABSCHNITT, KEINE KALTLAGERUNG	39
TABELLE 9- BAKTERIENSPECIES MIT MERKMALEN FÜR DEN THORAKALEN AORTENABSCHNITT, MIT KALTLAGERUNG	40
TABELLE 10- BAKTERIENSPECIES MIT MERKMALEN FÜR DEN ABDOMINALEN AORTENABSCHNITT, KEINE KALTLAGERUNG	41
TABELLE 11- BAKTERIENSPECIES MIT MERKMALEN FÜR DEN ABDOMINALEN AORTENABSCHNITT, MIT KALTLAGERUNG	42

8 Anhang

8.1.1 Bezeichnung Versuchsgruppen

Aorten- Abschnitt	Entnahmezeitpunkt postmortal	Lagerungsdauer bei 2-6 Grad Celsius	Nomenklatur
Aorta thoracalis	0 Stunden	0 Wochen	AT 0/0
		3 Wochen	AT 0/3
	36 Stunden	0 Wochen	AT 36/0
		3 Wochen	AT 36/3
Aorta abdominal	0 Stunden	0 Wochen	AA 0/0
		3 Wochen	AA 0/3
	36 Stunden	0 Wochen	AA 36/0
		3 Wochen	AA 36/3

8.1.2 Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
AT	Aorta thoracalis
AA	Aorta abdominalis
DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated-dUTP-biotin nick end labeling
CD31/PECAM	Cluster of Differentiation 31, Platelet endothelial cell adhesion molecule
SMAalpha	Smooth muscle actin alpha
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
TBS	Tris-buffered saline
PBS	phosphate buffered saline
FITC Antikörper	Fluorescein isocyanat Antikörper
HCCA	Alpha Cyano 4 Hydroxycinnamic acid
KBE	Kolonien Bildende Einheiten (Bakterien)
DGFG	Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation

PTFE	Polytetrafluorethylen
TPG	Organ- und Gewebetransplantationsgesetz
AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz)

9 Literaturverzeichnis

1. Vernon G. Alexis Carrel: 'father of transplant surgery' and supporter of eugenics. Vol. 69, British Journal of General Practice. Royal College of General Practitioners; 2019. p. 352.
2. Kunlin J. Le traitement de l'ischémie artéritique par la greffe veineuse longue. Rev Chir. 1951 Jul;70(7-8):206-35.
3. Kunlin J. Les greffes veineuses. J Int Chir. 1953 May;13(3).
4. Kunlin J, Pajot A, Cohen E, Merlat-Guitard R, Lengua F. Vein grafts in arteritic obliterations of the popliteal artery or tibio-peroneal tract. Technique and results. Journal of Cardiovascular Surgery. 1967 Sep;8(5):408-12.
5. Martin Börgel. Jahresbericht 2019 der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation. Hannover; 2019.
6. Chakfé N, Diener H, Lejay A, Assadian O, Berard X, Caillon J, et al. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical Practice Guidelines on the Management of Vascular Graft and Endograft Infections. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery [Internet]. 2020;59(3):339-84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.10.016>
7. Bisdas T, Bredt M, Pichlmaier M, Aper T, Wilhelmi M, Bisdas S, et al. Eight-year experience with cryopreserved arterial homografts for the in situ reconstruction of abdominal aortic infections. J Vasc Surg. 2010 Aug 1;52(2):323-30.
8. Teebken OE, Pichlmaier MA, Brand S, Haverich A. Cryopreserved arterial allografts for in situ reconstruction of infected arterial vessels. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2004 Jun 1;27(6):597-602.
9. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: Early and late results in 179 patients. J Vasc Surg. 2004;39(5):1009-17.

10. Bisdas T, Teebken OE. Optimierung des mikrobiologischen und histologischen Status der humanen Allografts. *Gefäßchirurgie* [Internet]. 2010;15(6):448–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00772-010-0843-5>
11. Bundesrepublik Deutschland. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz -AMG). 2005.
12. Schröder C. Von Mensch zu Mensch- Die postmortale muskuloskelettale und kardiovaskuläre Gewebespende in der Rechtsmedizin Eine retrospektive Auswertung der Jahre 2008 bis 2017. Dissertation Universität Hamburg. 2020;1.
13. European Union Project TSF. Euro GTP Guidance European Union Project in the framework of the Public Health Program Agreement number (2007).
14. Deutscher Bundestag. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz- TPG). Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. 2013;1–25.
15. Deutscher Bundestag. Zweiter Bericht der Bundesregierung über die Situation der Versorgung der Bevölkerung mit Geweben und Gewebezubereitungen. 2014;
16. Cox P, Roche D. Richtlinie 2004/23/EG des europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen. *Amtsblatt der Europäischen Union*. 2004;102:48–58.
17. Albertini JN, Barral X, Branchereau A, Favre JP, Guidicelli H, Magne JL, et al. Long-term results of arterial allograft below-knee bypass grafts for limb salvage: A retrospective multicenter study. *J Vasc Surg*. 2000;31(3):426–35.
18. T. Wille; U. Rauen. Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen. *Gefäßchirurgie* 2010, Springer Verlag. 2010;15:442–7.
19. Zatschler B, Dieterich P, Müller B, Kasper M, Rauen U, Deussen A. Improved vessel preservation after 4 days of cold storage : Experimental study in rat arteries. *YMVA* [Internet]. 50(2):397–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2009.04.064>
20. Annette Ebner P, Andreas Deussen, MD PhD Corresponding, Annette Ebner PZ. Evaluation of cold storage conditions for vessels obtained from donor rats after cardiac death. *J Vasc Surg*. 2011;54(6):1769–77.
21. Garbe S, Zatschler B, Müller B, Dieterich P, Ebner A, Rauen U, et al. Preservation of human artery function following prolonged cold storage with a

- new solution. *J Vasc Surg* [Internet]. 2011;53(4):1063–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2010.10.093>
22. Ebner A, Zatschler B, Deussen A. Evaluation of cold storage conditions for vessels obtained from donor rats after cardiac death. *J Vasc Surg*. 2011;54(6):1769–77.
 23. Wilbring M, Tugtekin SM, Zatschler B, Ebner A, Reichenspurner H, Kappert U, et al. Preservation of endothelial vascular function of saphenous vein grafts after long-time storage with a recently developed potassium-chloride and n-acetylhistidine enriched storage solution. *Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 2013 Dec;61(8):656–62.
 24. Weijmer MC, Vervloet MG, ter Wee PM. Compared to tunnelled cuffed haemodialysis catheters, temporary untunnelled catheters are associated with more complications already within 2 weeks of use. *Nephrol Dial Transplant*. 2004/02/10. 2004;19(3):670–7.
 25. Katja Anett Metzger. Diagnostik und Therapie atherosklerotischer Plaques mittels Ultraschallkontrastmittel am Mausmodell [Dissertation]. [München]; 2015.
 26. Majesky MW. Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2007 [cited 2019 Aug 17];27:1248–58. Available from: <http://www.atvbaha.org>
 27. Welsch U. Repetitorium Histologie. Vol. 1. Auflage. Urban&Fischer; 2006. 280 p.
 28. Braun Melsungen AG. Ringer- Injektionslösung B. Braun. FACHINFORMATION (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels). 2014;
 29. Carl Roth GmbH + Co. KG. BLUTAGAR (BASIS), Produkt- Datenblatt. 2017;4–5.
 30. BD Diagnostics. BD Mueller Hinton Chocolate Agar. 2011;1–5.
 31. Carl Roth GmbH + Co. KG. SCHAEGLER-AGAR, Produkt- Datenblatt. 2017;(1965):4–5.
 32. Schaedler RW, Dubos R, Costello R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1965;122:59–66.
 33. Mata LJ, Carrillo C, Villatoro E. Fecal microflora in health persons in a preindustrial region. *Appl Microbiol* [Internet]. 1969;17(4):596–602. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4890749><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC377749>
34. Parte AC. Vol. 42, *Nucleic Acids Research*. 2014 [cited 2019 Jul 31]. p. D613–6
LPSN- list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Available from:
<http://www.bacterio.net/index.html>
 35. Parte AC. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. [cited
2019 Jul 31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>
 36. Jashari R, Tabaku M, van Hoeck B, Cochez C, Callant M, Vanderkelen A.
Decontamination of heart valve and arterial allografts in the European Homograft
Bank (EHB): comparison of two different antibiotic cocktails in low temperature
conditions. *Cell Tissue Banking*. 2007;8:247–55.
 37. European Union, Tatarenko A. Guide to safety and quality assurance for organs,
tissues and cells 2nd edition [Internet]. F-67075 Strasbourg Cedex: Council of
Europe Publishing; 2004 [cited 2019 Aug 1]. Available from: <http://book.coe.int>
 38. Jashari R, van Hoeck B, Ngakam R, Goffin Y, Fan Y. Banking of cryopreserved
arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft
Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(4):589–99.
 39. Tabaku M, Jashari R, Carton HF, du Verger A, van Hoeck B, Vanderkelen A.
Processing of cardiovascular allografts: effectiveness of European Homograft
Bank (EHB) antimicrobial treatment (cool decontamination protocol with low
concentration of antibiotics). *Cell Tissue Bank*. 2004;5(4):261–6.
 40. Setacci C., De Donato G., Setacci F., Chisci E., Perulli A., Galzerano G. SP.
Management of abdominal endograft infection. *J Cardiovasc Surg (Torino)*.
2010;51(2):33–41.
 41. O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP. A systematic review and meta-
analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg*. 2006;44(1).
 42. Bergamini T, McCurry T, Bernard J, Hoeg K, Corpus R, Peyton J, et al. Antibiotic
Efficacy against *Staphylococcus epidermidis* Adherent to Vascular Grafts 1.
Journal of surgical research. 1996;6(0002):3–6.
 43. Laohapensang K, Arworn S, Orrapin S, Reanpang T, Orrapin S. Management of
the infected aortic endograft. *Semin Vasc Surg [Internet]*. 2017;30(2–3):91–4.
Available from: <https://doi.org/10.1053/j.sevasurg.2017.11.001>
 44. Post ICJH, Vos CG. Systematic Review and Meta-Analysis on the Management
of Open Abdominal Aortic Graft Infections. *European Journal of Vascular and*

- Endovascular Surgery [Internet]. 2019;58(2):258–81. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.03.013>
45. O'Hara PJ, Hertzner NR, Beven EG, Krajewski LP. Surgical management of infected abdominal aortic grafts: Review of a 25-year experience. *J Vasc Surg*. 1986;3(5):725–31.
 46. Quiñones Baldrich WJ, Hernandez JJ, Moore WS. Long-term Results Following Surgical Management of Aortic Graft Infection. *Archives of Surgery*. 1991;126(4):507–11.
 47. Ali A, Bahia SSS, Ali T. Cadaveric aorta implantation for aortic graft infection. *Int J Surg Case Rep* [Internet]. 2016;25:120–7. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijscr.2016.06.012>
 48. Zatschler B, Dieterich P, Müller B, Kasper M, Rauhen U, Deussen A. Improved vessel preservation after 4 days of cold storage: experimental study in rat arteries. *J Vasc Surg* [Internet]. 2009;50(2):397–406. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2009.04.064>
 49. Ducasse E, Calisti A, Speziale F, Rizzo L, Misuraca M, Fiorani P. Aortoiliac stent graft infection: current problems and management. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2019 Aug 2];18(5):521–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534730>
 50. de Grandis E, Oderich GS, Fatima J, Gloviczki P, Duncan AA, Bower TC, et al. Treatment strategies and outcomes in patients with infected aortic endografts [Internet]. Vol. 58, *Journal of Vascular Surgery*. 2013. p. 371–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2013.01.047>
 51. Oderich GS, Panneton JM, Bower TC, Cherry KJ, Rowland CM, Noel AA, et al. Infected aortic aneurysms: Aggressive presentation, complicated early outcome, but durable results. *J Vasc Surg*. 2001;34(5):900–8.
 52. Cooper MA, Upchurch Jr GR. The Society of Vascular Surgery Practice Guidelines on the Care of Patients With Abdominal Aortic Aneurysms Society of Vascular Surgery Practice Guidelines on Care of Patients With Abdominal Aortic Aneurysms Society of Vascular Surgery Practice Guidelines o. *JAMA Surg* [Internet]. 2019 Jun 1;154(6):553–4. Available from:
<https://doi.org/10.1001/jamasurg.2019.0566>
 53. Smeds MR, Duncan AA, Harlander-Locke MP, Lawrence PF, Lyden S, Fatima J, et al. Treatment and outcomes of aortic endograft infection. *J Vasc Surg*. 2016;63(2):332–40.

54. Masabni K, Weaver MR, Kandagatla P, Shepard AD, Huang J, al Adas Z, et al. Cryopreserved Allograft in the Management of Native and Prosthetic Aortic Infections. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2019;56:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2018.09.010>
55. Wille T, Groot H de, Rauhen U. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *Journal of vascular Surgery*. 2008;47(2):422–31.
56. Guo Q, Huang F, Qing Y, Feng S, Xiao X, Wang Y, et al. Decreased Jagged1 expression in vascular smooth muscle cells delays endothelial regeneration in arteriovenous graft. *Cardiovasc Res*. 2020 Nov 1;116(13):2142–55.
57. Qiu X, Lee BLP, Wong SY, Ding X, Xu K, Zhao W, et al. *x*. *Biomaterials*. 2021 Jan 1;268:120565.
58. Bruczko M, Wolańska M, Małkowski A, Sobolewski K, Kowalewski R. Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Human Neointima. *Pathobiology* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 May 28];83(1):47–52. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/442885>
59. Song H, Hoeger S, Hillebrands JL, Mandel I, Loesel R, Beck G, et al. CORMs protect endothelial cells during cold preservation, resulting in inhibition of intimal hyperplasia after aorta transplantation in rats. *Transplant International*. 2010 Nov;23(11):1144–53.
60. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int*. 2004;65:713–8.
61. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry* [Internet]. 2009 [cited 2022 Nov 9];70(5):220–33. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520299509108199>
62. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 1;21(23):1–12.
63. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2012 [cited 2022 Nov 9];887:41–7. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-860-3_5
64. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Herma R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary

- note. *Hepatology* [Internet]. 1995 [cited 2022 Nov 9];2:1465–8. Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.1840210534>
65. Loo DT. TUNEL assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Nov 9];203:21–30. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-179-5:21>
 66. de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventós J, Macaya A. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neurosci Lett*. 1997 Jul 11;230(1):1–4.
 67. Layton GR, Ladak SS, Abbasciano R, McQueen LW, George SJ, Murphy GJ, et al. The Role of Preservation Solutions upon Saphenous Vein Endothelial Integrity and Function: Systematic Review and UK Practice Survey. Vol. 12, *Cells*. MDPI; 2023.
 68. Veres G, Hegedus P, Barnucz E, Schmidt H, Radovits T, Zöller R, et al. TiProtec preserves endothelial function in a rat model. *Journal of Surgical Research*. 2015 May 8;200(1):346–55.

10 Geräte- und Materialliste

10.1 Technische Unterstützungsprogramme

Bezeichnung	Hersteller
Image J	1.47v , Wayne Rashband National Institutes of Health, USA http://imagej.nih.gov/ij
MS Word	Microsoft Word, zuletzt Version 16.81 (2024)
MS Excel	Microsoft Excel, zuletzt Version 16.82 (2024)
Mendeley	2008-2019, 2024 Mendeley Ltd., Version 2.109.0

10.2 Geräte

Bezeichnung	(Serien-) Nummer	Hersteller
Feinwaage	PCB 100-2	Kern PCB
Heiz- Magnetmixer	CB162	Stuart
Kühlschrank	CP 3813 Index 21C/001	Liebherr
Lichtquelle	KL1500 LCD	Leica
Mikroskop	Standard 25, 45VA Typ B	Zeiss
Mikrotom	Hn 40 (55160)	Reichert- Jung
PCR Amplifikation	Biorad T100 Thermal Cycler	BioRad
Präparationsmikroskop	M60 1,0x	Leica
Reine Werkbank	LaminAir Hb2448	Heraeus Instruments
Sterilisator	Steri250 (90 W)	FST
Thermomixer	Thermomixer comfort F1.G.A (1,5ml)	Eppendorf
Vortexer	IKA Vortex Genius 3	IKA
Wärmeschrank	Typ U15/ F-Nr. 810742	Memmert
Wärmeschrank		Binder
Wasserbad	1052	GFL
Zentrifuge	Biozym, Sprout TM, HSA 18709	Heathrow Scientific LLC
Zentrifuge	Biofuge 22R	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	BZ-X800	Keyence

10.3 Materialien

Bezeichnung	(Serien-) Nummer	Hersteller
Einbettkassetten		Engelbrecht Medizin und Labotechnik GmbH
Einbettschwämmchen		
Fluoromount G		Southern Biotech
Vasofix Safety Kanüle, 09.x25mm, G22	4269098A-01	Firma Braun

11 Chemikalien und Antikörper

11.1 TiProtec®

Dr. F. Köhler Chemie GmbH, D64603 Bensheim

Chargennummer 12152X1

11.1.1 TiProtec®- Lösung Teil 1 (100ml)

Inhaltsstoff	Menge (g)	Konzentration (mmol)
Natriumchlorid	0,085	1,4
Kaliumchlorid	0,564	7,3
Magnesiumchlorid (6H ₂ O)	0,169	0,8
Dinatriumhydrogenphosphat	0,015	0,1
Calciumchlorid (2H ₂ O)	0,001	0,005
N- Acetylhistidin (H ₂ O)	0,671	3,0
Tryptophan	0,042	0,2
a- Ketoglutarsäure	0,03	0,2
Asparaginsäure	0,69	0,5
Glycin	0,078	1,0
Alanin	0,046	0,5
Deferoxaminmesilat	0,0053	0,0082
3,4- Dimethoxy-N- methylbenzhydroxamsäure	0,00035	0,0017

11.1.2 TiProtec®- Lösung Teil 2 (3,7ml)

Glucose -Monohydrat	0,198	1,0
---------------------	-------	-----

11.1.3 HCCA Matrixlösung für MALDI- TOF Analyse

Bezeichnung	Hersteller/Herstellung	Lagerung
1,5ml Reaktionsgefäß	Eppendorf	
Alpha- cyano- 4 hydroxycinnamic acid	Bruker	6-12°C

Wasser (Chromasolv)	Sigma Aldrich (39253-1L-R)	RT
Acetonitril (Chromasolv)	Sigma Aldrich (49673-1L)	RT
Ameisensäure	Sigma Aldrich (94318-250ML-F)	RT
70% Ameisensäurelösung	700µl Ameisensäure und 300µl Wasser in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mischen	
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Aldrich	6-12°C

11.1.4 Verbrauchsfertige Lösungen und vorbereitete Versuchskits

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Hersteller
Ringer Lösung	Natriumchlorid 8,6g Kaliumchlorid 0,30g Calciumchlorid 0,33g	Braun
RNA Later Solution	RNA Sabilization Solution 500ml	Ambion
RNA Kit	RNAeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50) Ref. 74704 GTIN: 04053228012665	Qiagen GmbH Hilden
RNA Kit 2	Rotor Gene SYBR Green PCR Kit Cat.Nr.: 204076	Qiagen GmbH Hilden
Phosphate Bufferd Saline (PBS)	pH 7,4 1,9g Na ₂ HPO ₄ 0,32g NaH ₂ PO ₄ 9,0g NaCl	
Tris Buffered Saline (TBS)	pH 7,6/ 0,05M 6,1g Tris Base (Trizma base) 8,8g NaCl HCl NaOH	Sigma Roth Roth Merck
Citratpuffer	pH 6,1 / 294,1 M 2,94 g/l Tri- Na-Citrat Dihydrat	Roth
Antikörper SMAα	F3777	Sigma Aldrich
Antikörper CD31	Ab28364	Abcam
Sekundärantikörper	Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	Invitrogen
Antibody diluent		Invitrogen
DAPI	DAPI 1µg/ml	Roth

cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	#K1649 10µl Maxima Enzyme mix 50µl 5X Reaction Mix 1,25 ml Water, nuclease free	Thermo Scientific
ApopTag Fluoreszein- In-Situ- Apoptosenachweis- Kit	Artikelnummer: S7110	Sigma Aldrich

12 Färbeprotokolle

12.1 Hämatoxylin- Eosin- Färbung



Hämatoxylin- Eosin- Färbung Paraffin, Maus

Protokollnr.:	Datum:	Durchführung: <i>Anke Meier</i>
Titel:		
Gewebe: <i>Aorta thoracica und abdominalis der Maus</i>		
pos. Gewebe:	neg. Gewebe:	neg. Kontr.:
Präparatnr.:		

Paraffin-Schnitte	Entparaffinieren				
	Xylol 1-3	3x 5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 100%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 96%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 70%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
optional	Ethanol 50%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Aqua dest.	Spülen bis keine Schlieren mehr zu sehen sind	RT		<input type="checkbox"/>

Hämatoxylin		1,5 min	RT		<input type="checkbox"/>
Verdünnung	1:2 Hämatoydin : Wasser				<input type="checkbox"/>
Spülen	Unter fließendem Wasser	10 min	RT		<input type="checkbox"/>
Eosin		10 min	RT		<input type="checkbox"/>
Waschen	Ethanol 96%	Kurz durchziehen	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 100%	Kurz durchziehen	RT		<input type="checkbox"/>
	Xylol 1-3%	Kurz durchziehen	RT		<input type="checkbox"/>

Eindecken	Eukitt	Aufbewahren der Schnitte bei RT im Dunkeln			<input type="checkbox"/>
------------------	---------------	--	--	--	--------------------------

Ergebnis:

12.2 Cluster of Differentiation 31- Smooth Muscle Actin alpha -Kombinationsfärbung



CD 31-SMAalpha-Färbung

Paraffin, Maus

Protokollnr.:	Datum:	Durchführung: Anke Meier
Titel:		
Gewebe: <i>Aorta thoracica und abdominalis der Maus</i>		
pos. Gewebe:	neg. Gewebe:	neg. Kontr.: ohne Primär-AK
Präparatnr.:		

Paraffin-Schnitte	Entparaffinieren				
	Xylol 1-3	3x je 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>
	Ethanol 100%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 96%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Ethanol 70%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
optional	Ethanol 50%	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Aqua dest	5 min	RT		<input type="checkbox"/>
waschen	In TBS	3x je 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>
Vorbehandlung	Citratpuffer-Retrieval (2,94 g/l, pH 6,1	40 min Ca. 20min	Kochendes Wasserbad Abkühlen bei RT und dann im Eis		<input type="checkbox"/>
waschen	In TBS	3x je 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>

Umranden der Schnitte mit Fettstift

Primärantikörper 1	SMAalpha (gelabelt mit FITC)	60 min	RT		<input type="checkbox"/>
Verdünnung	1:500				<input type="checkbox"/>
	Sigma-Aldrich Lagerung bei -20°C 2mg/ml Keine Isokontrolle	Katalog-Nr. F3777			
Verdünnung in Antibody diluent	Invitrogen	Katalog-Nr. 00-3218			
	Waschen in TBS	3x 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>

Primärantikörper 2	Rabbit-anti-mouse CD 31 Antigen	o.n.	4°C		<input type="checkbox"/>
Verdünnung	1:50				<input type="checkbox"/>
	Abcam Lagerung bei -20°C Isokontrolle: Rabbit AK	Katalog-Nr. ab28364			
Verdünnung in antibody diluent	Invitrogen	Katalog-No. 00-3218			
	Waschen in TBS	3x 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>



Sekundärantikörper 1	Donkey-anti-rabbit-IgG-Alexa Fluor 594	45 min	RT		<input type="checkbox"/>
Verdünnung	1:400				<input type="checkbox"/>
	Invitrogen				
Verdünnung in Antibody diluent	Invitrogen	Katalog-Nr. 00-3218			
	Waschen in TBS	3x 5 min		1 2 3	<input type="checkbox"/>

Gegenfärbung	DAPI (1µg/ml)	1 min	RT		<input type="checkbox"/>
	Waschen in TBS	3x 5 min	RT	1 2 3	<input type="checkbox"/>
Eindecken	Fluoromount	Aufbewahren der Schnitte bei -20°C			<input type="checkbox"/>

Ergebnis:



Materialien:

TBS: Tris buffered Saline 0,05 M pH 7,6

- 6,1 g Tris-Base: Trizma® base, Sigma
- 8,8 g NaCl: Natriumchlorid, Roth
- HCl, Roth
- NaOH, Merck

Citratpuffer: 294,1 M, 0,01 mol/l, 2,94 g/l, pH 6,1

- 2,94 g/l Tri-Na-Citrat-Dihydrat: Roth

Antikörper:

- SMAα, F3777, Sigma-Aldrich
- CD31, ab28364, Abcam

Sekundärantikörper:

- Alexa Flour 594 donkey anti-rabbit IgG, Invitrogen

Antibody diluent, Invitrogen

Dapl: 1 µg/ml, Roth

Sonstige:

Fettstift: Dako Pen, Dako

Objektträger, Hecht

Deckgläser, Marlenfeld

Fluoromont-G, Southern Biotech

13 Danksagung

Für die Unterstützung und Mühen in den verschiedenen Abschnitten der Erstellung dieser Arbeit, angefangen von der Ideenfindung, den Experimenten, der herausfordernden Auswertung und dem Wege der Verschriftlichung.

Ich möchte allen Personen, die mich auf diesem Wege begleitet haben, meinen tiefen und aufrichtigen Dank aussprechen.

Insbesondere den unten genannten Personen:

- Herrn Prof. Dr. E. Sebastian Debus, für die Überlassung des Themas, das Vertrauen in die wissenschaftliche Bearbeitung und Erstellung der Promotion und die Betreuung auf diesem Weg
- Herrn Dr. Holger Diener als Betreuer und Begleiter
- Meinen Eltern und meinem Bruder
- Herrn Dr. Jens Strohäker und Frau Dr. Eva Breuer für die kritische Redaktion und Ideengebung
- Dem ganzen Team im Labor der Gefäßmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in Hamburg- jedoch insbesondere Frau Astrid Becker, Herrn Dr. Markus Geißen, Herrn Dr. Günter Daum für die Einführung in die experimentelle Methodik und Begleitung während meiner Laborzeit mit all den auftretenden Fragen
- Herrn PD Dr. Olaf Hellwinkel für die Mitbetreuung und Expertise
- Dem gesamten Team des mikrobiologischen Labors des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf, insbesondere Herrn Prof. Dr. Holger Rohde und Herrn Dr. Martin Christner für die Betreuung und Begleitung
- Herrn Dr. Andreas Lübke des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf für die Begutachtung und Beratung
- All den vielen Freunden und Bekannten, die mich unterstützt und motiviert haben

14 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

15 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: