

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan FACS, FRCSC

Beurteilung von kryopräservierten Rattenarterien im in-vivo Modell nach Transplantation

Dissertation

zum Erlangen des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Christian Oliver Dahm

aus Hamburg

2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.02.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Prof. Dr. E. S. Debus

**Diese Arbeit ist
meinem Vater und meiner Mutter
gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1.	Interventions- und Operationsmöglichkeiten	3
1.2.	Gefäßprothesen	6
1.3.	Allogene Gefäßtransplantate	7
1.4.	Kryokonservierung	8
1.5.	Kryoprotektoren	10
1.6.	Studienaufbau	12
1.7.	Fragestellung	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Versuchstiere	14
2.2.	Gruppeneinteilung	14
2.2.1.	Kontrollgruppe	14
2.2.2.	Versuchsgruppen	15
2.3.	Im- und Explantation der Gefäße	16
2.4.	Kryokonservierung	19
2.5.	Histologische Methoden	21
2.5.1.	Masson Goldner Färbung	22
2.5.2.	Immunhistologische Färbung	23
2.6.	Lichtmikroskopische Beurteilung der Färbungen	25
2.6.1.	Beurteilung Masson Goldner Färbung	25
2.6.2.	Beurteilung RECA-1 Antikörperfärbung	26
2.7.	Fotodokumentation	28
2.8.	Statistik	28

3.	Ergebnisse	29
3.1.	Überlebensrate der Ratten	29
3.2.	Anzahl der Endothelzellkerne	32
3.3.	Ausbildung von Anastomosen-Aneurysmata	34
3.4.	Intimahyperplasie	36
3.4.1.	Häufigkeit von Intimahyperplasien in den Gefäßtransplantaten	36
3.4.2.	Ausdehnung der Intimahyperplasien	39
3.4.3.	Ratio der Intima-Media Fläche	42
3.5.	Funktionalität der Elastica-Fasern der Tunica media	44
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
5.	Diskussion	49
5.1.	Erhalt von Endothelzellen	51
5.2.	Ausbildung von Aneurysmata	53
5.3.	Ausbildung von Intimahyperplasien	55
5.4.	Veränderungen der Elastica-Fasern der Tunica media	58
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Abkürzungen	73
9.	Geräte und Materialien	74
10.	Danksagung	76
11.	Lebenslauf	77
12.	Eidesstattliche Versicherung	78

1. Einleitung

Alle Organe sind in ihrer Funktionsweise abhängig von ihrer Durchblutung und damit Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Eine Unterversorgung bedeutet immer eine Funktion- bzw. eine Leistungseinschränkung.

Als Ursachen für eine Unterversorgung kommen unter anderem eine reduzierte Pumpleistung des Herzens oder ein Gefäßschaden in Frage. Bei der Versorgung der Organe und des Gewebes kommt insbesondere den Gefäßen eine entscheidende Rolle zu. Sie regulieren den Blutstrom durch unterschiedliche Weitstellung des Gefäßquerschnitts. Dazu ist jedoch eine intakte Gefäßwand notwendig.

Ist diese geschädigt, kann es zu Unterversorgung bis hin zum Infarkt des nachgeschalteten Gewebes kommen. Manche Schädigungen der Gefäße und nachfolgende Durchblutungsstörungen können durch konservative Maßnahmen kompensiert bzw. verbessert werden. Viele Schädigungen bedürfen jedoch einer interventionellen bzw. operativen Therapie, um eine Funktionseinschränkung bzw. einen Untergang des peripheren Gewebes zu verhindern.

1.1. Interventions- und Operationsmöglichkeiten

Kurzstreckige Gefäßverengungen können dabei häufig interventionell mittels Ballondilatation oder mit einem Stent wieder weit gestellt werden und haben insbesondere cranial des Leistenbandes gleichwertige Ergebnisse im Vergleich zu der Bypasschirurgie (Parsons et al. 1998).

Längerstreckige oder lang bestehende Stenosen bzw. Verschlüsse benötigen fast immer einer operativen Versorgung mittels Bypass. Die Percutane Transluminale Angioplastie (PTA) zeigt bei diesen Verschlussarten schlechte Ergebnisse, insbesondere distal des Leistenbandes (Van de Zaag et al. 2004; Parsons et al. 1998).

Bei Hybridverfahren werden interventionelle Verfahren wie PTA und Stentimplantationen mit dem operativen Vorgehen verbunden.

Als Operationsverfahren kommen unterschiedliche Verfahren und Materialien zum Einsatz. Zur Rekanalisierung von frisch thrombosierte Gefäßen erfolgt der Einsatz von Ballonkathetern (Fogarty-Katheter). Gefäßstenosen, insbesondere im Bereich von Gefäßaufzweigungen, können mittels offener oder halb offener Thrombendarteriektomie (TEA) wieder eröffnet und mit einer abschließenden Patchplastik erweitert werden.

Längerbestehende thrombotische oder arteriosklerotische Verschlüsse können per Bypassverfahren umgangen werden.

Für Bypassoperationen haben sich bisher am besten patienteneigene, sogenannte autologe Gefäße, aufgrund gleicher Antigenität und geringster Thrombogenität, bewährt. Am häufigsten werden dabei venöse Gefäße insbesondere bei längerstreckigen Bypässen genutzt.

Erste aortocoronare Bypassverfahren mit autologen Venen erfolgten durch den argentinischen Herzchirurgen Rene Favoloro im Jahre 1967. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die venösen Gefäße im arteriellen Kreislauf mehr Schaden nehmen als transplantierte Arterien (Sabik et al. 2005; Muehrke et al. 1998; Motwani und Topol 1998).

Statistische Untersuchungen bezüglich Verschlüssen von venösen Bypässen am Herzen zeigten, dass 7% im ersten postoperativen Jahr einen Verschluss aufweisen, innerhalb von 5 Jahren kommt es bei 26% zu einem Verschluss und nach 10 Jahren sind nur noch ca. 41% der Bypässe offen (Barner et al. 1985).

Die Ursache hierfür wird zum einen den Endothelschäden und dadurch bedingter beschleunigter Atherosklerose der Gefäße im arteriellen Blutkreislauf durch den für Venen unnatürlich hohen Blutdruck zugeschrieben, zum anderen iatrogenen Gefäßschäden, die beim zeitaufwendigen und meist auch traumatisierenden Freipräparieren und Skelettieren von Venen auftreten sowie Gefäßwandschädigungen durch die Nähte im Bereich der Anastomosen. Nachfolgend können Intimahyperplasien und Stenosen sich ausbilden (Dashwood et al. 2009; Dashwood et al. 2004; Souza et al. 1999).

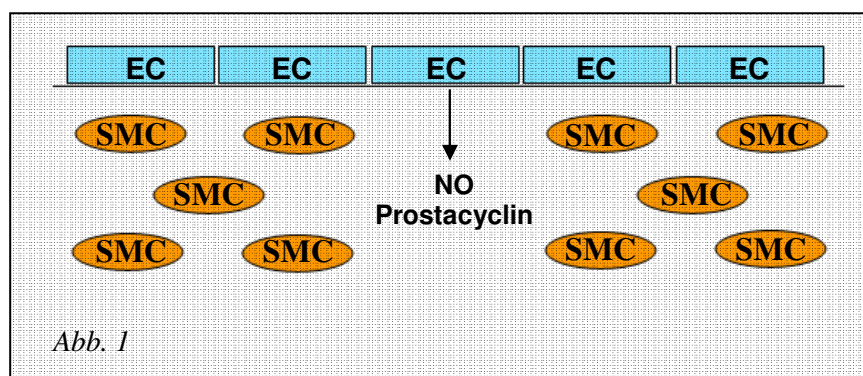


Abbildung 1 zeigt schematisch eine gesunde Gefäßwand mit Endothelzellen (EC) und normaler Stickstoffmonoxid- (NO) und Prostacyclinbildung, die antiproliferativ und vasodilativ wirken, sowie glatten Muskelzellen (SMC) in der Media.

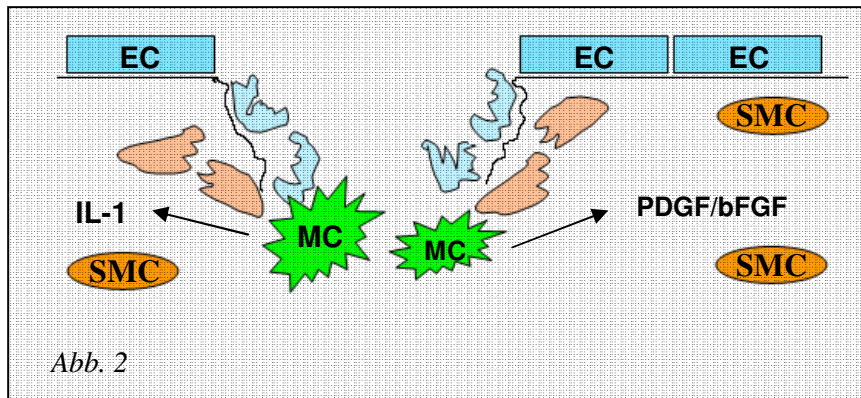


Abbildung 2 zeigt einen Gefäßwandschaden. Es werden unter anderem chemotaktische Interleukine (IL) und Wachstumsfaktoren wie basic fibroblastic growth factor (bFGF) und platelet derived growth factor (PDGF) durch zerstörte glatte Muskelzellen und Immunzellen (MC) freigesetzt. Zusätzlich kommt es zum Abfall der NO-Synthese.

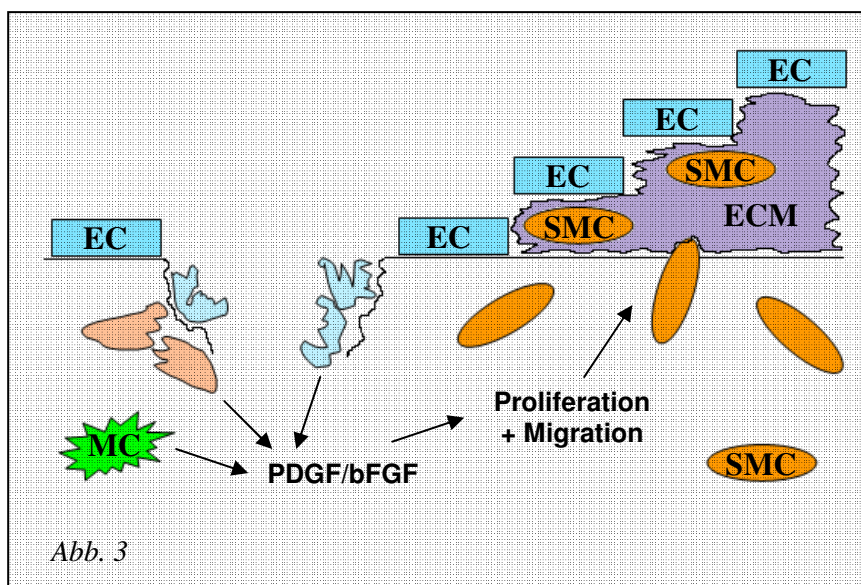


Abbildung 3 zeigt die Ausbildung einer Intimahyperplasie nach Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) der Media, Migration dieser in die Intima und Bildung von extrazellulärer Matrix (ECM) subendothelial.

In der Bypasschirurgie am Herzen hat sich daher der Einsatz von arteriellen Bypässen insbesondere der Arteria thoracica interna hinsichtlich Stenosen und Gefäßverschlüssen am besten bewährt (Klotz und Scheld 2007; Sabik et al. 2005; Motwani und Topol 1998; Boylan et al. 1994; Barner et al. 1985).

Autologe arterielle Gefäße als Bypässe stehen jedoch nur zur Überbrückung über kürzere Distanzen zur Verfügung. An den Extremitäten werden aber häufig langstreckige bzw. weiter zentral großlumige Bypässe benötigt, wie zum Beispiel bei Bauchaortenaneurysmata.

Ein Nachteil sowohl venöser als auch arterieller autologer Gefäße ist, dass diese häufig aufgrund von Voroperationen oder generalisiertem Gefäßleiden nicht im ausreichenden Maße zur Verfügung stehen. Zudem müssen diese häufig zeitaufwendig und den Patienten zusätzlich traumatisierend gewonnen werden.

1.2. Gefäßprothesen

Eine Alternative hierzu bieten künstliche Gefäßprothesen, sogenannte Allografts, die meist aus Dacron oder Polytetrafluorethylen (PTFE) bestehen. Wobei PTFE und Dacron in Studien zum Teil gegensätzlich bezüglich der postoperativen Durchgängigkeit bewertet werden (Jensen et al. 2007; Davidovic et al. 2004; Miyazaki et al. 2002; Davidovic et al. 1997).

Der Vorteil der Allografts ist die unbeschränkte Verfügbarkeit in allen Größen und Längen. Studienvergleiche zeigen jedoch, dass bei Implantation von Allografts eine erhöhte Verschlussrate gegenüber Venen sowohl nach zwei Jahren als auch nach fünf Jahren Nachbeobachtungszeit zu verzeichnen ist (Klinkert et al. 2004; Klinkert et al. 2003; Jackson et al. 2000; Tilanus et al. 1985).

Insbesondere Allografts mit Diametern unter 6mm Durchmesser haben ein schlechtes Outcome im Vergleich zu autologen Gefäßen (Abott et al. 1997).

In der aorto-koronaren Bypasschirurgie sind die bisherigen Erfahrungen mit den künstlichen Grafts wenig erfolgversprechend. PTFE-Prothesen wurden in verschiedenen Studien als Alternative zur Vena saphena magna eingesetzt.

Sapsford et al implantierte PTFE-Grafts von 4 mm Durchmesser in einer Patientengruppe. Die von ihm untersuchten Prothesen waren nach 12-29 Monaten postoperativ nur teilweise offen (Sapsford et al. 1981).

Hartmann et al empfiehlt die Anwendung von PTFE-Grafts in der aorto-koronaren Bypasschirurgie nur für Notfälle (Hartmann et al. 1991).

Zusätzlich zeigte sich ein weiterer bedeutender Nachteil von alloplastischen Prothesen. Sie sind signifikant höher infektionsgefährdet als autologe Gefäßtransplantate (Bandyk et al. 2001).

Dies schränkt den Einsatz der Allografts, insbesondere bei multimorbiden, abwehrgeschwächten Patienten, weiter ein.

Um die Verschlussrate der Gefäßprothesen weiter zu senken, hat Deutsch et al mit Hilfe von Tissue Engineering Gefäßprothesen mit autologen Endothelzellen besiedelt. Im Vergleich zu PTFE-Prothesen zeigten diese eine signifikant höhere Offenheitsrate.

Diese biosynthetischen Hybriden zeigen eine geringere Oberflächenthrombogenität, welche die Funktionsfähigkeit bzw. die Offenheitsrate der Bypässe erhöht (Heyligers et al. 2005; Deutsch et al. 1999).

Das Tissue Engineering hat im Bereich der Endothelialisierung von Gefäßprothesen für die distalen Gefäße die experimentelle Phase bereits verlassen und findet zum Teil klinischen Einsatz. Das Herstellen von Gefäßprothese mit autologen Endothelzellen ist jedoch zeitaufwendig und teuer und schränkt damit deren Einsatz ein.

1.3. Allogene Gefäßtransplantate

Bei den vielen Nachteilen von künstlichen Gefäßprothesen lag der Gedanke nahe, allogene Gefäße zum Einsatz zu bringen.

Die allogene Transplantation beschreibt die Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen zwischen genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies.

Es zeigte sich jedoch für frische allogene Gefäßtransplantate eine hohe postoperative Verschlussrate von über 90%. Hauptgrund für die schlechten Ergebnisse ist die Antigenität der Transplantate, auf die die Empfänger mit einer Abstoßungsreaktion reagieren (Stephen et al. 1978).

Ein weiteres Problem bereitet die Lagerung der allogenen Gefäße.

Mit zunehmender Lagerungszeit zeigte sich ein umgekehrt proportionaler Abfall von vitalen Zellen in den Gefäßen (Angell et al. 1987).

Der Erhalt der Zellen und ihrer Funktion im Transplantat ist jedoch von großer Bedeutung bezüglich der Offenheitsrate der allogenen Gefäße nach der Transplantation (O'Brien et al. 1987).

1.4. Kryokonservierung

Zur Lagerung der Gefäße wurde auf schon zum großen Teil etablierte Verfahren aus der Herzklappenchirurgie zurückgegriffen (O'Brien et al. 1987).

Man suchte eine Möglichkeit zur dauerhaften Lagerung mit möglichst geringem Zellschaden. Eine retrospektive Studie über kryokonservierte Herzklappen zeigte sehr gute Ergebnisse. Keine dieser Herzklappen musste innerhalb der nachfolgenden zehn Jahre wegen degenerativer Veränderungen nachoperiert werden (O'Brien et al. 1987).

Es bot sich die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff an. Eine Lagerung in flüssigem Stickstoff bringt die biochemischen Prozesse in den Zellen zum Stillstand und sorgt so für Stabilität. Aber die Kryopräservierung bringt auch ungelöste Probleme mit sich.

Werden Zellen in wässrigen Medien langsam eingefroren, so werden Eiskristalle zunächst im extrazellulären Raum gebildet. Das restliche extrazelluläre Volumen verringert sich zunehmend und dabei steigt die Konzentration von gelösten Salzen deutlich an.

Das ursprünglich bestehende osmotische Gleichgewicht zwischen extrazellulärem Raum und dem intrazellulären Raum gerät aus dem Gleichgewicht. Die Zellen verlieren durch den sich aufbauenden osmotischen Gradienten Wasser an den extrazellulären Raum, schrumpfen und dehydrieren (Kryodehydration). Der Wasserverlust der Zelle hängt von der Geschwindigkeit des Temperaturabfalls ab, da Wasser nicht ungehindert durch die semipermeablen Zellmembranen diffundieren kann.

Ein langsamer Temperaturabfall erzeugt einen hohen Wasserverlust bzw. Dehydration der Zellen und eine hohe Salzkonzentration intrazellulär, die zelltoxisch wirkt. Ein schneller Temperaturabfall verhindert einen zu großen Wasserverlust der Zellen, dadurch steigt aber die Gefahr der intrazellulären Eiskristallbildung, die wiederum Zellstrukturen zerstören kann. Mazur hat diese beiden schädigenden Einflüsse bei der Kryopräservierung als Zwei-Faktor-Hypothese beschrieben (Mazur et al. 1972).

Weitere Riskofaktoren der Zellschädigung bei der Kryopräservierung sind:

- die mechanischen Effekte der extrazellulären Eisbildung
- die Entstehung von elektrischen Feldern und Gasblasen an den Eis-Medium-Grenzflächen, die mit der Zellmembran reagieren
- Veränderung des pH-Wertes und der Viskosität der Restlösung

Die möglichen Vorteile allogener Gefäße gegenüber alloplastischen Gefäßprothesen bezüglich der Infektanfälligkeit und den Vorteil der alloplastischen Gefäße bezüglich der guten Verfügbarkeit wollte man durch die Kryokonservierungstechnik verbinden. Insbesondere erhoffte man sich eine erhöhte Offenheitsrate von kryokonservierten allogenen Gefäße gegenüber Gefäßprothesen.

Boren et al konnten 1978 erstmals erfolgreich Kaninchenarterien kryokonservieren. In weiteren Experimenten zeigte sich jedoch, dass zwar meist eine gut erhaltene Endothelfunktion nach Kryokonservierung bestand, die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur jedoch häufig stark beeinträchtigt war (Paquinelli et al. 2006; Almassi et al. 1996; Schoeffter und Müller-Schweinitzer 1990).

Klinische Ergebnisse mit kryokonservierten Gefäßen schwanken sehr und sind weitestgehend nur in Fallbeispielen beschrieben. So wurden starke Degenerationen und Rupturen von Transplantaten beschrieben, aber auch erfolgreiche Behandlungen von Protheseninfektionen oder mykotischen Aneurysmata (Lesèche et al 2001; Knosalla 2001; Castier et al. 1999; Lehalle et al. 1997; Vischjäger et al. 1996).

Gut konservierbar sind einzelne Zellen oder kleinere Zellverbände. Aber bereits bei größeren Zellverbänden oder sehr unterschiedlich zusammengesetztem Gewebe gibt es große Probleme.

Es musste also die Technik der Kryokonservierung verbessert werden. So wurden unterschiedliche Lagerungsmethoden vor dem Einfrieren untersucht sowie der Temperaturabfall während der Kryokonservierung als auch der Temperaturanstieg beim Auftauen (Rendal et al. 2004; Buján 2001; Pegg 1997; Song et al. 1995; Abebe et al. 1993; Delfino et al. 1993).

1.5. Kryoprotektoren

Eine besondere Rolle kam bei der Konservierung den unterschiedlichen Medien zu, in denen die zu konservierenden Gefäße gelagert werden sollten. Es wurden Medien benötigt, in denen man die autologen Gefäße nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch die Funktion der Zellen gut erhalten konnte.

Zum Erhalt der Zellen gibt es intra- und extrazelluläre Kryoprotektoren, die alle gut wasserlöslich sind. Die intrazellulären Kryoprotektoren dringen in die Zellen ein, reduzieren den Wasseranteil, binden die Wassermoleküle und reduzieren so die Eiskristallbildung, die die Zellstrukturen zerstören können.

Zu den intrazellulären Protektoren zählen Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie Glycerol, Dimethylacetamid oder Äthylenglycol. DMSO wird dabei am weitaus häufigsten als Kryoprotektor eingesetzt (Ashwood-Smith und Farrant 1980).

Extrazelluläre Kryoprotektoren bestehen aus makromolekularen Substanzen, die nicht die Zellwände durchdringen können. Sie binden das Wasser außerhalb der Zelle und senken so die Kristallbildung außerhalb der Zellen. Zusätzlich reduzieren sie die Salzkonzentration außerhalb der Zellen und verringern die Zellschrumpfung. Zu ihnen zählen unter anderen Chondroitinsulfat (CHSO), Dextran, Albumin, Polyethylenoxid und Polyethylenglycol (Ashwood-Smith und Farrant 1980).

Der Zellschutz durch die Protektoren vor Eiskristallen während der Kryopräservierung ist dosisabhängig. Je höher die Konzentration gewählt wird, umso höher ist jedoch auch deren Zelltoxizität. Diese führt zur Destabilisierung von Zellproteinen.

Bisher erfolgte die Kryokonservierung von Gefäßen in experimentellen Studien häufig mit DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Ergebnisse bezüglich des Erhalts aller Wandstrukturen waren jedoch nicht befriedigend, sodass weitere Protektoren zur Verbesserung der Ergebnisse eingesetzt wurden.

Böhnke et al setzte erstmals 1987 CHSO als Kryoprotektor bei Hornhäuten von Schweinen mit guten Ergebnissen ein (Böhnke et al. 1987).

Brockbank et al berichtete 1994 über die Konservierung von venösen Gefäßen in einer Kombination aus 10% DMSO und 2,5% CHSO in flüssigem Stickstoff. In den Nachuntersuchungen zeigte sich eine gute Funktion des Endothels und eine dabei noch befriedigende Kontraktilität der Tunica media (Brockbank 1994). In pharmazeutischen Studien konnte gezeigt werden, dass CHSO bei humanen Leukozyten die direkte Chemotaxis, die Phagozytose und die Freisetzung von Lysozymen herabsetzt (Ronca et al. 1998).

In einer Arbeit von Schmidt 1998 wurden die Erfolg versprechenden Ergebnisse durch eine Kombination des extrazellulären Kryoprotektors Chondroitinsulfat und des intrazellulären Kryoprotektors DMSO übernommen und an kryopräservierten arteriellen Gefäßen experimentell untersucht, da Arterien für Bypassoperationen in Bezug auf das funktionelle Ergebnis besser geeignet sind (Boylan et al. 1994; Barner et al. 1985).

Zusätzlich erhoffte man sich bessere Ergebnisse durch die Kombination dieser beiden Protektoren, da man die Konzentration des zytotoxisch wirkenden DMSO reduzieren konnte. Es zeigte sich, dass bezüglich des gleichmäßigen Erhalts aller Wandschichten die günstigsten Ergebnisse durch eine Kombination beider Kryoprotektoren erzielt wurden (Schmidt 1998).

Um die Ergebnisse dieser experimentellen Studie zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine Studie an einem in-vivo Modell durchgeführt. Hierbei wurden Aorten aus Spenderratten explantiert, in Medien mit dem Kryoprotektor DMSO und in Medien aus einer Kombination der Kryoprotektoren DMSO und Chondroitinsulfat kryokonserviert, die in der Arbeit von Schmidt 1998 die günstigsten Ergebnisse zeigten, und anschließend in Empfängerratten implantiert. Die implantierten Gefäße wurden nach vier bzw. vierundzwanzig Wochen wieder explantiert, nachuntersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen (*Abbildung 4*).

Studienaufbau

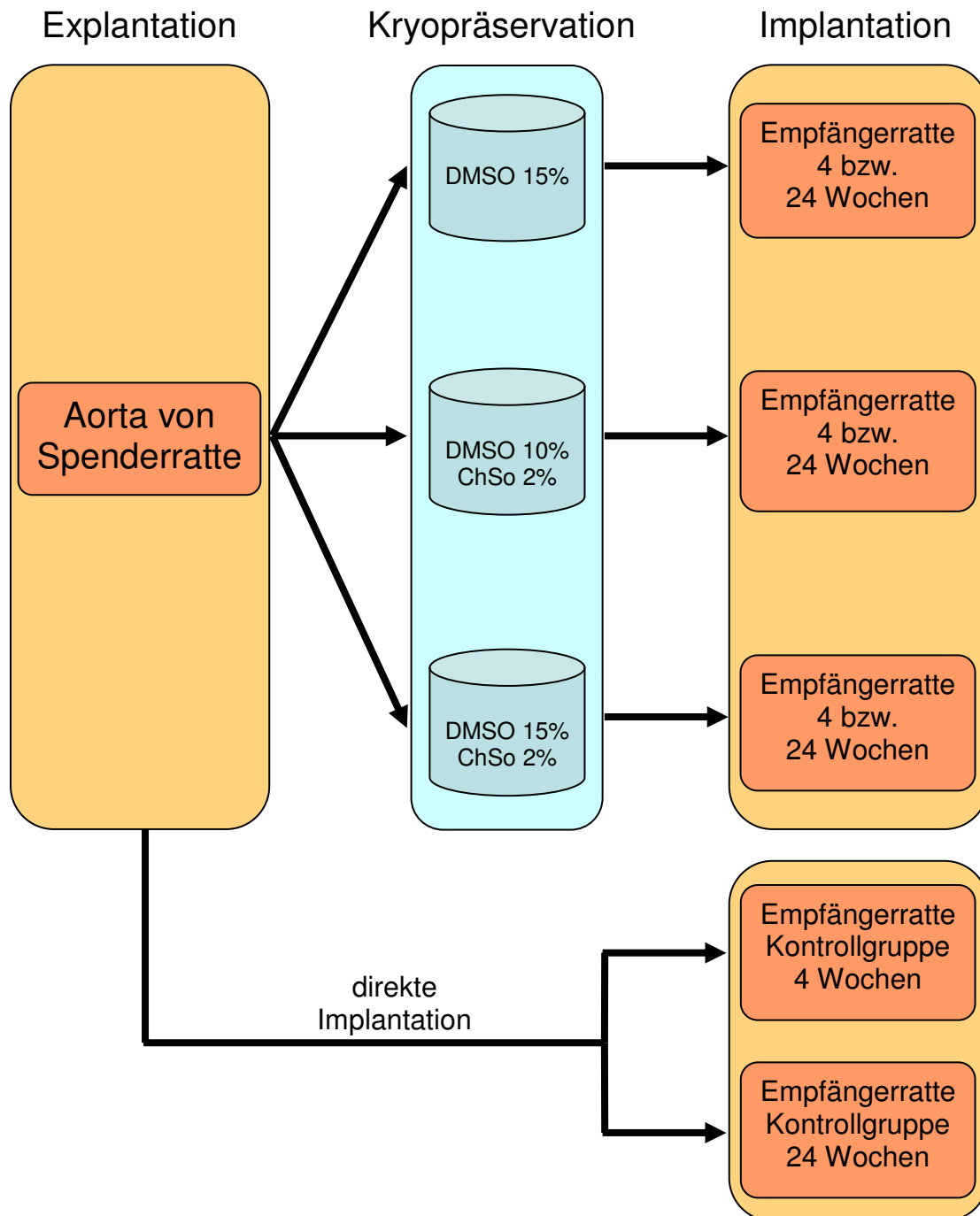


Abb. 4

Abbildung 4 zeigt den Studienaufbau. Es erfolgte zunächst die Explantation der Aortensegmente von Spenderratten. Die Aortensegmente wurden dann in unterschiedlichen Medien kryopräserviert. Nach dem Auftauen der Aortensegmente wurden diese wieder in Ratten implantiert und nach 4. bzw. 24. Wochen erneut explantiert und nachuntersucht.

Fragestellung der Arbeit:

1. Welchen Effekt hat die Kryopräservierung von Aorten auf den Erhalt von Endothelzellen und elastischen Fasern nach Transplantation in Ratten.
2. Wie wirkt sich der Einsatz der Kryoprotektors DMSO einzeln oder in Kombination mit CHSO auf die Ausbildung von Aneurysmen und Intimahyperplasien aus?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden über die Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bezogen. Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Tiere vom Rattenstamm LEWIS/Han.

Die Tiere wurden zu je fünf Tieren in einem Käfig mit Pressfutter und Wasser gehalten.

Die Ratten, aus denen die Bauchaorten explantiert wurden, wogen zwischen 250g und 350g und waren zwischen drei und vier Monaten alt. Bei der Implantation der zuvor kryokonservierten Gefäße wogen die Empfängertiere aus der Gruppe der vierwöchigen Nachbeobachtungsgruppe zwischen 270g und 390g. Die Empfängertiere aus der vierundzwanzigwöchigen Nachbeobachtungsgruppe wogen zwischen 265g und 400g.

2.2. Gruppeneinteilung

Die entnommenen infrarenalen Aorten wurden in unterschiedlich zusammengesetzten und konzentrierten Kryoprotektoren tiefgefroren.

2.2.1. Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe sind diejenigen Tiere, die direkt nach Explantation der Bauchaorta einer Spenderratte diese wieder implantiert bekamen (*Tabelle 1*).

Sie diente als Referenzgruppe für die spätere histologische Auswertung.

Gruppe	Kryoprotektor	Anzahl der Tiere	Beobachtungszeit
K	keiner	n = 10	4 Wochen
K	keiner	n = 10	24 Wochen

Tabelle 1

2.2.2. Versuchsgruppen

Die explantierten Aortae abdominales wurden in Kryoprotektoren von unterschiedlicher Zusammensetzung in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren (Tabelle 2).

4 Wochen Gruppe	Kryoprotektor	Anzahl der Tiere
G 1	15% DMSO	n = 10
G 2	10% DMSO + 2% CHSO	n = 10
G 3	15% DMSO + 2% CHSO	n = 10

24 Wochen Gruppe	Kryoprotektor	Anzahl der Tiere
G 1	15% DMSO	n = 10
G 2	10% DMSO + 2% CHSO	n = 10
G 3	15% DMSO + 2% CHSO	n = 10

Tabelle 2

Tabelle 2 zeigt die Einteilung der Versuchsgruppen der explantierten Aortensegmente, die mit unterschiedlichen Kryoprotektoren kryopräserviert und 4 bzw. 24 Wochen nachbeobachtet wurden.

2.3. Im- und Explantation der Gefäße

Die Narkose der Ratten zur Ex- oder Implantation erfolgte als Inhalationsnarkose in einem gedeckelten Fünfliter-Glastrog nach verdunsten von 1,5ml Methoxyfluoran. Eine ausreichende Narkosetiefe ist nach etwa zwei Minuten erreicht. Anschließend erfolgt die Lagerung der Ratte auf dem OP-Tisch in Rückenlage auf einem Korkbrett.

Die Extremitäten werden mit Tapestreifen umwickelt und diese wiederum auf dem Korkbrett mit groben Nadeln fixiert. Die Narkose wird mit 1,5ml Methoxyfluoran geführt, das in einer Komresse gelöst ist, welche in einem 30ml Zentrifugenröhrchen liegt. Die Öffnung des Zentrifugenröhrchens wird teilweise über die Schnauze der Ratte geschoben. Die Narkosetiefe ist mittels der Atemfrequenz der Ratte zu führen.

Nach Fixierung, Desinfektion des Abdomens und ausreichender Narkosetiefe erfolgt die Medianlaparotomie mit der Schere vom tiefen Unterbauch bis zum Xiphoid. Nach Eröffnen der Bauchhöhle werden die Laparotomieränder mittig rechts und links mit je einer sterilen Injektionsnadel von innen nach außen durchstochen. Die Injektionsnadeln werden dann im Korkbrett fixiert, um das Abdomen offen zu halten.

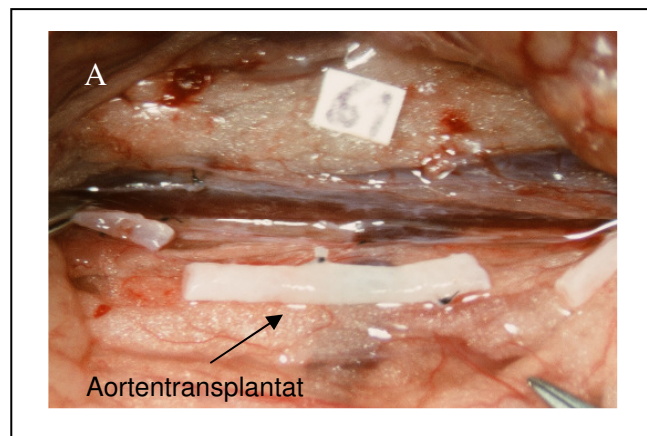
Die weitere Operation erfolgt unter dem Operationsmikroskop. Es erfolgt nun das Darstellen und Inzision des Retroperitoneums von proximal der Nierenarterien bis zur Bifurcation der Aorta abdominalis. Das retroperitoneale Fettgewebe wird mit sterilen Wattestäbchen stumpf beiseite gedrängt. Die genaue Freipräparierung der Aorta abdominalis mit Darstellung aller Abgänge erfolgt teils stumpf teils scharf mit spitzen Klemmchen und der Federschere nach Müller. Zunächst Ligatur der Abgänge mit 8/0 Monosof (USSC). Dann werden die feinen Bulldog-Klemmen direkt distal der Nierenabgangsarterien und proximal der Bifurcation der Aorta abdominalis gesetzt.

Bei der Explantation von Gefäßen zur Kryokonservierung wird die Aorta, im Gegensatz zur Implantation, unmittelbar proximal und distal der Bulldog-Klemmen mit der Federschere abgesetzt, um eine möglichst lange Aorta abdominalis zu gewinnen. Die Gefäßlänge liegt zwischen 15 und 20mm. Das Gefäß wird sofort mit NaCl 0,9% gespült und anschließend in ein 1,8ml fassendes Kryogefäß mit dem entsprechenden Einfriermedium (siehe Gruppen) eingelegt und verschlossen.

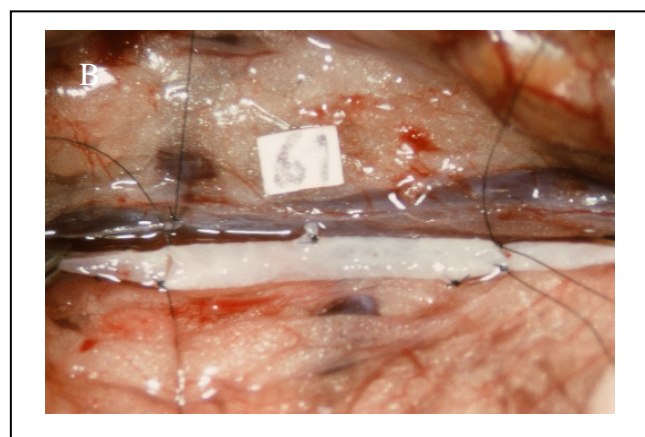
Die Spenderratte wird nun umgehend mittels einer Überdosierung der Methoxyfluorannarkose schmerzfrei getötet.

Anschließend erfolgte die Kryokonservierung im Cryoson BV 25 (*Abb. 4*).

Bei der Implantation der kryokonservierten Gefäße wird ein ausreichend langes Stück (2-3mm) Aorta proximal und distal der Bulldog-Klemmen belassen, um das Spendergefäß leichter zu implantieren (*Abb. A*).



Nach Explantation wird das im 37° C warmen NaCl-Bad aufgetaute Spendergefäß implantiert. Hierbei wird über je zwei Eckfäden das Spendergefäß an der proximalen Aorta der Empfängerratte fixiert (*Abb. B*).



Es erfolgt zunächst die Naht der Hinterwand mit einer fortlaufenden Naht (8-0 Monosof) und dann die fortlaufende Naht der Vorderwand mit dem zweiten Eckfaden. Das gleiche Vorgehen erfolgt für die distale Anastomosierung.

Hiernach wird zuerst die distale Bulldog-Klemme gelöst und dann, bei ausreichender Dichtigkeit der Anastomosen, die proximale Bulldog-Klemme (*Abb. C*).



Noch gegebenenfalls bestehende Blutungen an den Anastomosen werden mit Einzelknopfnähten übernäht. Nach kompletter Blutstillung ordnen der inneren Organe. Der Verschluss der Bauchhöhle erfolgt mit einer fortlaufenden durchgreifenden Naht (3-0 Polysorb).

Absetzen der Inhalationsnarkose. Die Aufwachphase des Tieres wird sorgfältig bis zum selbstständigen Laufen des Tieres im Käfig überwacht.

2.4. Kryokonservierung

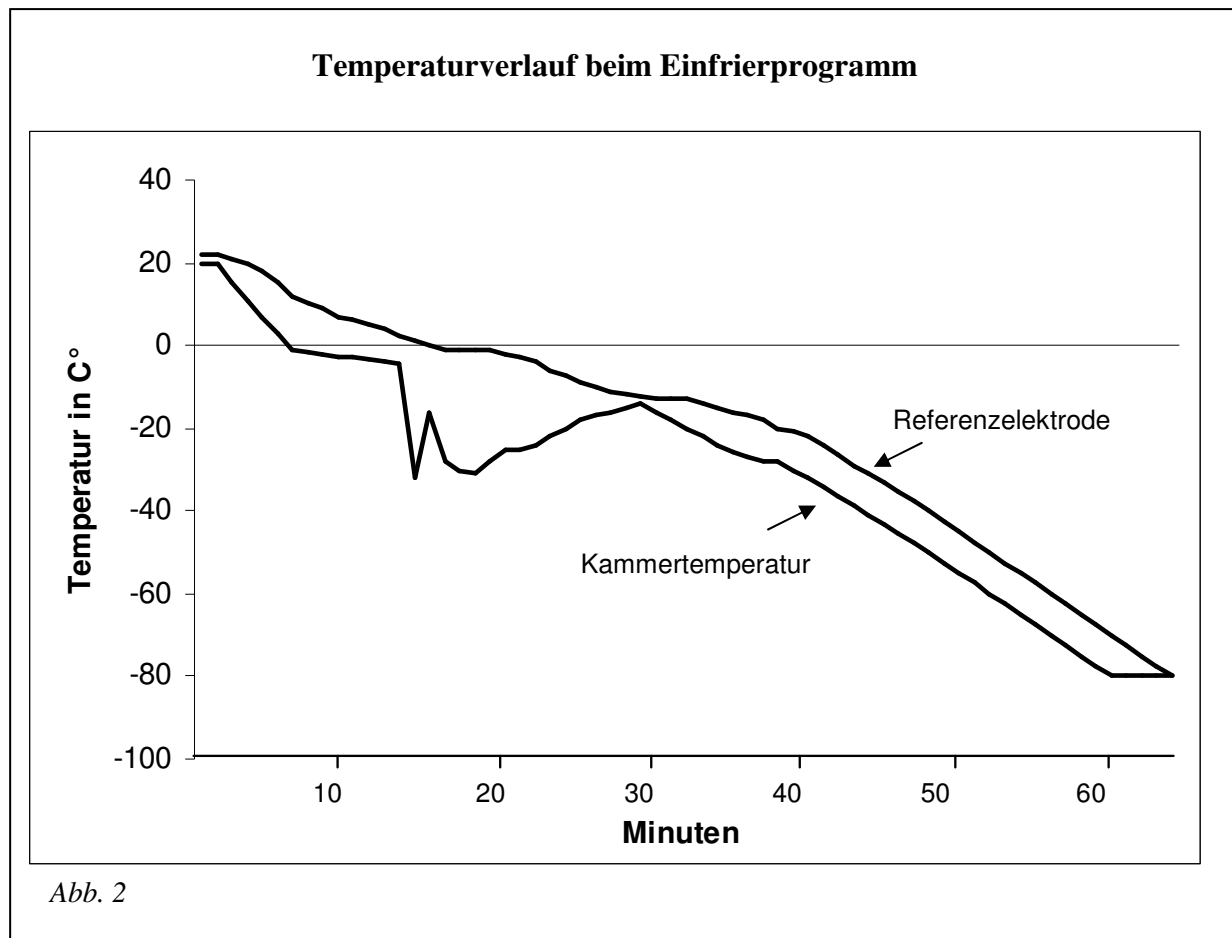
Das Einfriermedium wurde in einem sterilen Abzug angesetzt und bestand aus Medium 199, fetalem Kälberserum (BSA) 10% und der entsprechenden Konzentration des Kryoprotektors der unterschiedlichen Versuchsgruppen (*Tabelle 2*). Die Kryopräservierung erfolgte in Cryotubes der Firma NUNC in das je eine Aorta mit dem entsprechenden Einfriermedium gegeben wurde. Neben diesem Gefäß wurde ein Gefäß mit dem gleichen Einfriermedium und einer Referenzelektrode in dem Cryoson BV 25 platziert. Das Gefäß diente zur Temperaturverlaufskontrolle und enthielt keine Aorta.

**Gefäßeinfrierprogramm: BIO 4.05 biologisches Einfriersystem
IPC-286 Copyright Cryoson Hi-Tech BV 1993**

Segment	Laufzeit (Min.)	Endtemperatur (°C)
1	5.0	0.0
2	10.0	-5.0
3	0.3	-32.0
4	2.0	-32.0
5	2.0	-25.0
6	2.0	-25.0
7	4.0	-10.0
8	15.0	-30.0
9	20.0	-80.0

Tabelle 3

Tabelle 3 zeigt die schrittweise Abkühlung der Kühlkammer über die einzelnen Zeiträume bis zum Erreichen der Zieltemperatur.



Die Abbildung 2 zeigt den Abfall der Temperatur bezogen auf die Zeit (Minuten). Die obere Kurve stellt den Temperaturabfall in dem Gefäß mit der Referenzelektrode dar. Die untere Kurve bildet den Temperaturverlauf in der Kammer des Cryoson BV 25 ab. Als korrekt abgeschlossene Einfriervorgänge wurden nur jene gewertet, die eine abfallende Gerade in der Temperaturkurve des Referenzgefäßes zeigten.

Nach abgeschlossenem Einfriervorgang im Cryoson BV 25, wurden die Gefäße bei einer Temperatur von -80°C der Einfrierkammer entnommen und in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerungstank bei -196°C gelagert.

Die Spendergefäße wurden in dem Stickstofftank zwischen 9 und 13 Monaten bis zur Implantation gelagert.

Das Auftauen erfolgte nach Entnahme aus dem Stickstofftank langsam über ca. 10 Minuten, anschließend im Wasserbad bei 37°C und dann schrittweise Ausspülen des Kryoprotektors in 0,9% NaCl.

2.5. Histologische Methoden

Nach endgültiger Explantation wurden die Gefäße kurz in 0,9% NaCl-Lösung gespült und anschließend in Formaldehyd fixiert. Danach wurden die Gefäße für 2 Stunden in PBS eingelegt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 80%, 96% und 100% Isopropanol für jeweils eine Stunde. Hiernach wurden die Gefäße in Rotihistol für 1 Stunde eingelegt. Abschließend erfolgte die Einbettung im Paraffinbad für 24 Stunden.

Die histologischen Schnitte erfolgten transversal an einem Schlitten-Mikrotom der Firma Microm GmbH in $5\mu\text{m}$ Dicke. Die Schnitte wurden dann auf silanisierte Objektträger der Firma Marienfeld aufgezogen.

2.5.1. Masson Goldner Färbung

Diese Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Entparaffinieren in Rotihistol	2x 5 min
Rehydrieren in Ethanol 100%	2x 5 min
Ethanol 96%	2x 2 min
Ethanol 70%	2x 2 min
 Färben in Mayers Haematoxylin Solution	 10 min
 Bläuen in Leitungswasser (fließend) für	 10 min
 Waschen in destilliertem Wasser	 2x 10 Sekunden
 Färben in Trichromlösung	 10 min
 Waschen in destilliertem Wasser	 2x 10 Sekunden
 Dehydrierung in Ethanol 70%	 2x 2 min
Ethanol 96%	2x 2 min
Ethanol 100%	2x 5 min
Rotihistol	2x 5 min
 Eindeckeln in Eukitt/Entellan	

2.5.2. Immunhistologische Färbung

Mouse anti Rat RECA-1 (Paraffin)

Entparaffinieren in	Xylol	2x 5 min
Rehydrieren in	Ethanol 100%	2x 2 min
	Ethanol 96%	2x 2 min
	Ethanol 70%	2x 2 min

Demaskierung in 25ml Target Retrieval Puffer + 225ml Aqua dest. im Autoklaven GLA 40 (Geräteprogramm) der Fa. KG Fritz Gössner ca. 70 min

Spülen in Aqua dest. kurz

Block der endogenen Peroxidase 3% H₂O₂ in Methanol (20ml 30% H₂O₂ + 180 ml Methanol) pH 7,4 5 min

Waschen in Aqua dest. kurz

Waschen in TBS 1:10 2x 3 min

Block 1% BSA in TBS (2g/200ml TBS) 20 min

Flüssigkeit abklopfen, aber nicht austrocknen lassen

Schnitte mit DaKo Pen(Fettstift) umranden

Primär Antikörper(PAK) RECA-1 (bzw. MOPC 21 für Negativkontrolle) in Dako Antibody Diluent 1:50 verdünnen und bei Raumtemperatur inkubieren

Envision +R System HRP(DAB) 60 min

Waschen in TBS 1:10 (PAK und Negativkontrolle getrennt) 2x 5 min

Flüssigkeit abklopfen, aber nicht austrocknen lassen

Inkubation in HRP konj. Polymer (-ready to use-)	30 min
Waschen in TBS 1:10	2x 5 min
DaKo Substrat DAB + Chromogen (lichtgeschützt)	15 min
Spülen in Aqua dest.	kurz
Meyers Haematoxylin Solution	7 min
Bläuen unter fließendem Leitungswasser	10 min
Spülen in Aqua dest.	kurz
Dehydrierung in	
Ethanol 70%	2x 2 min
Ethanol 96%	2x 2 min
Ethanol 100%	2x 2 min
Xylol	2x 5 min
Eindeckeln in Eukitt/Entellan	

2.6. Lichtmikroskopische Beurteilung der Färbungen

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an Transversal-Schnitten der Gefäße unter dem Lichtmikroskop bei 40- bis 80-facher Vergrößerung und mit dem Computerprogramm Image J 1.40g (Java-Programm, Publicdomain, rsb.info.nih.gov/ij).

Die Masson Goldner Färbung erfolgte zur Beurteilung der Anzahl der Endothelzell-Kerne im Bereich der Implantate sowie deren Intimahyperplasie in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens, ihrer Fläche und in deren Größenverhältnis zur Tunica Media. Zusätzlich wurden im Bereich der Implantate die Elastica-Fasern der Tunica Media an den histologischen Schnitten mit der Masson Goldner Färbung erhoben.

Die immunhistochemische Färbung mit dem RECA-1 Antikörper erfolgte zur Darstellung der Endothelzellschicht und deren Integrität.

2.6.1. Beurteilung Masson Goldner Färbung

Die Anzahl der Endothelzellen erfolgte an den histologischen Schnitten der Masson Goldner Färbung. Da an einem einzelnen Transversalschnitt nicht jeder Zellkern der vorhandenen Endothelzelle angeschnitten wird, wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte ausgezählt und deren Mittelwert pro μm umschlossenes Gefäßlumen gebildet. Eine hohe Anzahl an Endothelzellkernen wurde mit einem guten Kryokonservierungsergebnis gleichgesetzt. Die *Abbildung 12* stellt exemplarisch Implantate verschiedener Gruppen in Bezug des Endothels gegenüber und in *Abbildung 13* werden die Mittelwerte der Endothelzellkern-Anzahlen pro μm des umschlossenen Lumens der einzelnen Gruppen dargestellt.

Das Auftreten einer Intimahyperplasie wurde anhand der histologischen Schnitte mit „Ja“ bzw. „Nein“ bewertet und für jede untersuchte Gruppe in Prozent angegeben. Die Ausdehnung der Intimahyperplasie spielte dabei keine Rolle.

In der *Abbildung 12* werden Intimahyperplasien von Implantaten und Anastomosen unterschiedlicher Gruppen dargestellt. Zusätzlich werden Aortenabschnitte der Empfängerratten cranial der Implantate gezeigt. In der *Abbildung 13* wird das Auftreten von Intimahyperplasien in den einzelnen Gruppen in Prozent dargestellt.

Zusätzlich wurde an Hand der Schnitte mit der Masson Goldner Färbung die Fläche der ausgebildeten Intimahyperplasien der einzelnen Implantate ins Verhältnis zur Fläche der Tunica media ($\text{Ratio Intima}/(\text{Intima}+\text{Tunica media})$) gesetzt. Die einzelnen Flächen wurden per Hand mit dem Computerprogramm Image J 1.40g ausgemessen und in μm^2 angegeben. Die Ausdehnung der Intimahyperplasien der einzelnen Implantate in den unterschiedlichen Gruppen zeigt die *Abbildung 15*. In der *Abbildung 16* wird die $\text{Ratio Intima}/(\text{Intima}+\text{Tunica media})$ dargestellt.

Anhand dieser Färbung wurde der Grad der Schlängelung der Elastica Fasern der Tunica Media semiquantitativ von schlecht bis sehr gut eingeteilt, wobei schlecht mit „0“ und sehr gut mit „3“ bewertet wurde. Die Ausprägung der Schlängelung wurde mit der Spannung der Fasern und damit mit der Funktionalität der Elasticafasern gleich gesetzt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ und ist in der *Tabelle 4* und *Abbildung 18* dargestellt.

2.6.2. Beurteilung RECA-1 Antikörperfärbung

Diese Färbung wurde zur Darstellung der Endotheloberfläche und ihrer Integrität ausgewählt. Dabei bindet der RECA-1 Antikörper (Rat Endothelial Cell Antibody) an den Oberflächen-Antigenen der Endothelzellen von Ratten und kann immunhistochemisch angefärbt werden. Zu jeder Färbereihe eines Implantates wurde zusätzlich eine Negativ-Kontroll-Färbung durchgeführt, um sicher zu stellen, dass nur das Endothel spezifisch angefärbt wird. Der Antikörper ist für die Färbung von Kryoschnitten ausgelegt.

Da die histologische Auswertung der Implantate jedoch größten Teils auf die Masson Goldner Färbung ausgelegt war, wurden die Implantate in Paraffin eingebettet. Die Färbung der Paraffin-Schnitte mit dem Antikörper erwies sich als sehr schwierig, da die Gefäßschnitte bzw. die Endotheloberfläche zunächst demaskiert werden mussten, um eine Färbung mit dem RECA-1 Antikörper zu ermöglichen.

Dies konnte jedoch nach vielen Versuchen nur bei hohen Temperaturen im Autoklaven ausreichend durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass die hohen Temperaturen die Schnitte auf den Objektträgern trotz ständigem Feuchthalten (siehe Färbeprotokoll) qualitativ deutlich beeinträchtigten. Die Schnitte warfen Wellen auf den Objektträgern und schlugen zum Teil um. Zusätzlich traten Gewebsbrüche im Bereich des Endothels und der Media auf, die bei dem gleichen Präparat in der Trichromfärbung nicht auftraten.

Man muss daher davon ausgehen, dass die Behandlung der Schnitte im Autoklaven die Ergebnisse bezüglich der Endothelialisierungsrate erheblich beeinflusst, sodass eine korrekte Auswertung nicht möglich ist. Eine verwertbare Aussage über die Integrität der Endotheloberfläche konnte lediglich in weniger als der Hälfte der Schnitte erfolgen.

Daher wurden die Ergebnisse dieser Färbung nicht in die Auswertung dieser Arbeit mit einbezogen und nur exemplarisch in der *Abbildung 3* gezeigt.

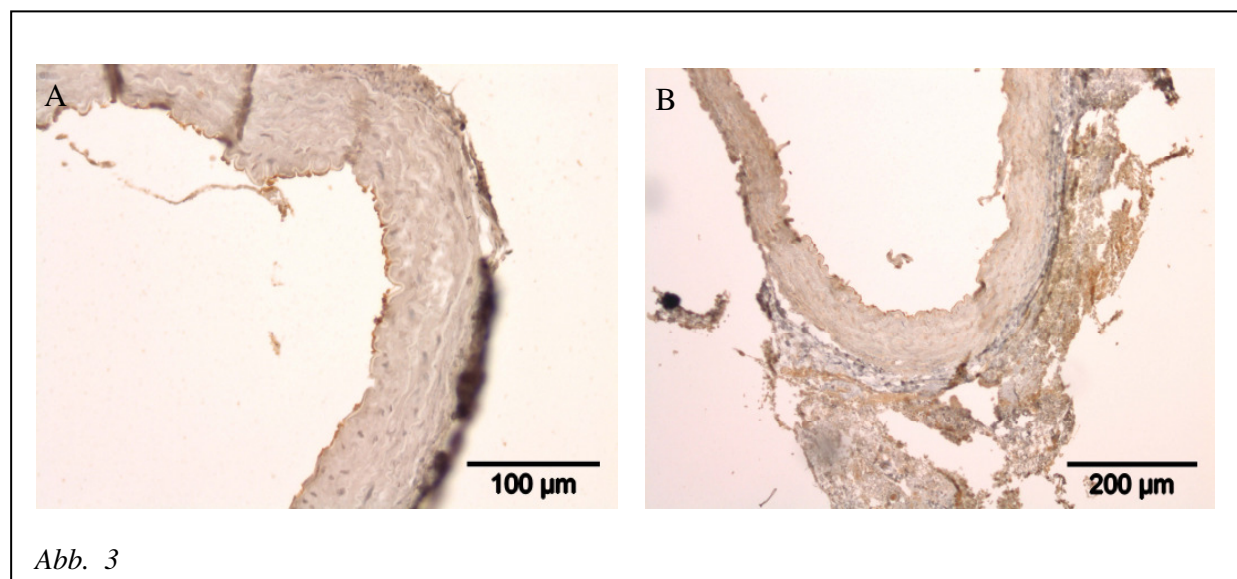


Abbildung 3 zeigt die bei der immunhistochemischen Färbung aufgetretenden Artefakte mit Ablösung des Endothels, Brüchen der Media und Wellen im Transplantat (A 20 fach und B 6,4 fach vergrößert).

2.7. Fotodokumentation

Die makroskopische Dokumentation der Gefäßimplantate erfolgte durch ein Fotomikroskop der Fa. Olympus mit einem Film von Kodak (Ektachrom 160T). Die histologischen Bilder wurden ebenfalls mit einem Mikroskop der Fa. Olympus (digital) aufgenommen und mit dem Computerprogramm Image J 1.40g bearbeitet.

2.8. Statistik

Die Daten wurden der deskriptiven Statistik zugeführt und ausgewertet und in Form von Balken- und Punktdiagrammen dargestellt. Die Aussagen bezüglich der Signifikanz erfolgten durch den Mann Whitney Rank Sum Test.

3. Ergebnisse

Untersucht wurden folgende Punkte:

- Überlebensrate der transplantierten Ratten
- Anzahl der Endothelzellkerne
- Ausbildung von Aneurysmata
- Intimahyperplasie
 - a. Häufigkeit des Auftretens einer Intimahyperplasie
 - b. Intimahyperplasie-Fläche
 - c. Verhältnis der Intimahyperplasie-Fläche zur Gesamtfläche der Gefäßwand im Transversalschnitt (Ratio)
- Schlingelung der Elastica-Fasern der Tunica media

3.1. Überlebensrate der Ratten

Zunächst wurde die Überlebensrate der Empfängerratten untersucht. Sie wurde als Maß für die technische Ausführung der Narkoseführung und der Transplantation der Gefäße gewertet. Hierbei zeigte sich eine gleichmäßig hohe Überlebensrate der Ratten von nahezu 100%. Lediglich in der Gruppe G3 verstarb ein Tier nach 61 Tagen frühzeitig bei einer Thrombose der Aortenbifurkation und der Beckenstrombahn bei einem Aneurysma des Implantates. Die Überlebensrate wird in der *Abbildung 4* dargestellt.

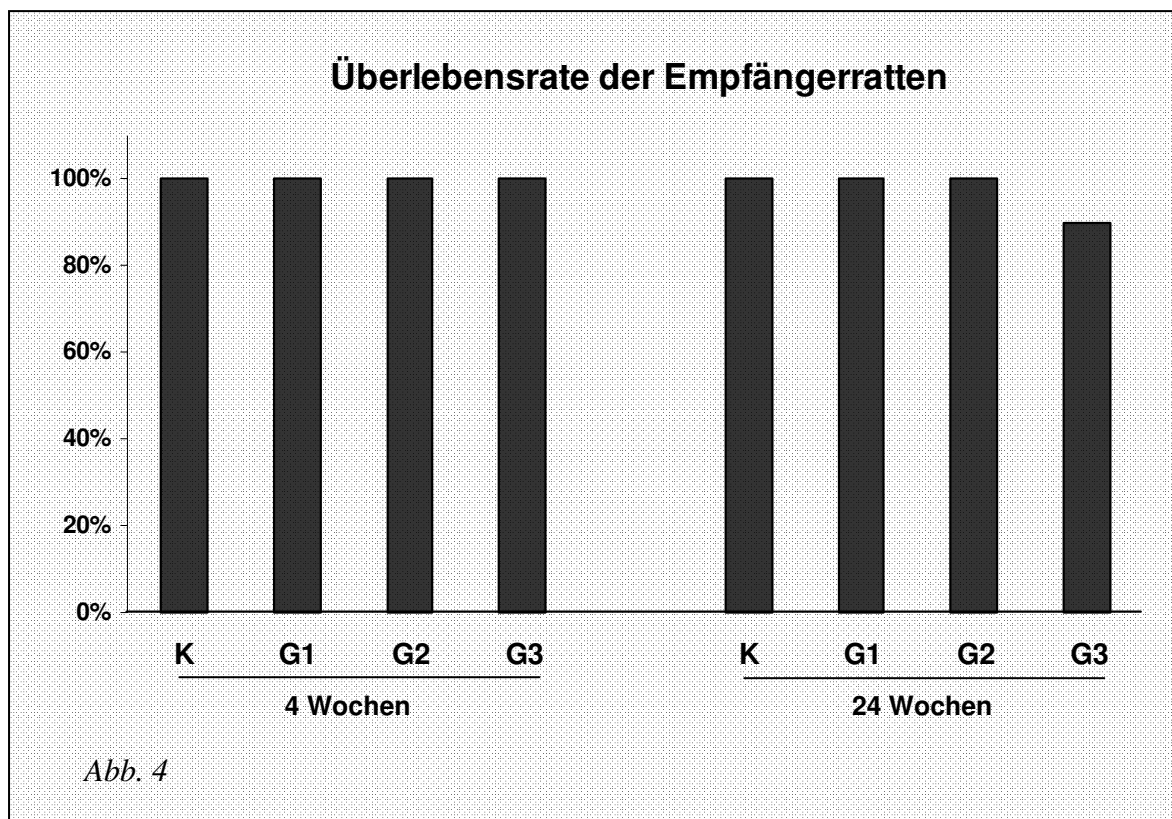


Abbildung 4 zeigt die Überlebensrate der Ratten in den Untersuchungsgruppen nach Implantation der Aortensegmente.

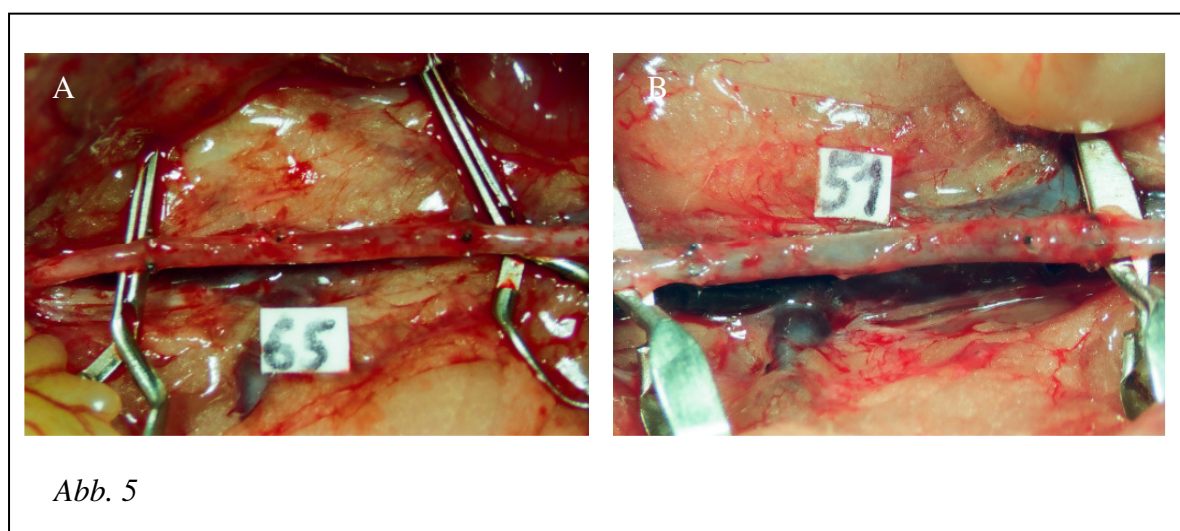
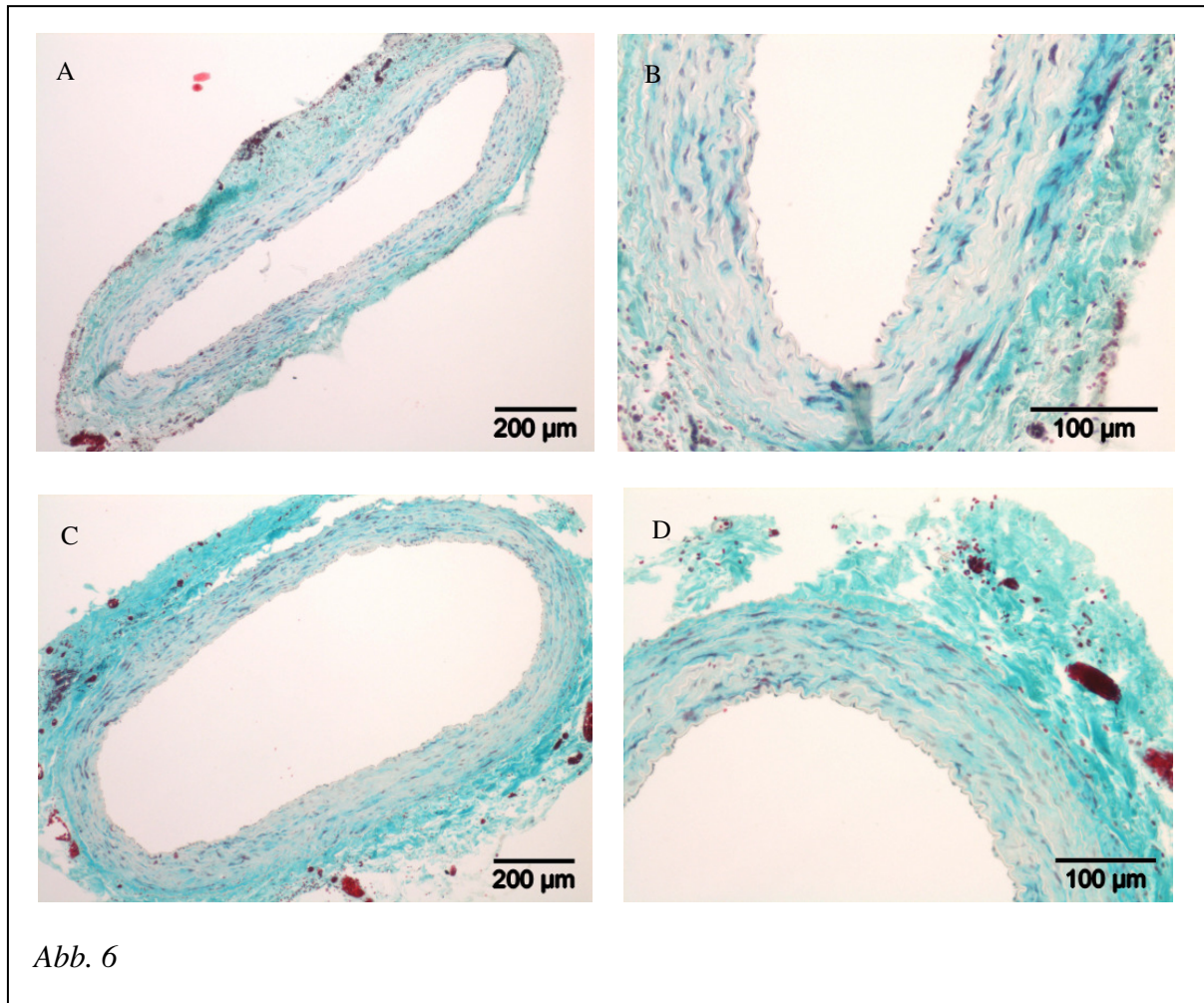


Abbildung 5 zeigt beispielhaft je ein Aortentransplantat vor Explantation nach 4 Wochen (A) und nach 24 Wochen (B) Implantationszeit.



Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft Transversalschnitte der Masson-Goldner Färbung ((A+C)6,4-fach und (B+D)20-fach vergrößert). Die mikroskopisch unauffälligen Implantate der Gruppen G1 und G3 nach 4 bzw. 24 Wochen. Es findet sich keine Intimahyperplasie sowie eine gleichmäßig gute Schlängelung der Elastica-Fasern mit geringer Ödembildung.

3.2. Anzahl der Endothelzellkerne

Hierbei wurde die Anzahl der Endothelzellkerne pro μm umschlossenen Lumens in den einzelnen Gruppen erhoben und untereinander verglichen.

Dabei fanden sich signifikante Unterschiede in dem Nachbeobachtungszeitraum über 4 Wochen in den Gruppen G1 (15% DMSO) und G3 (15% DMSO + 2% CHSO) im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe G3 zur Kontrollgruppe im Nachbeobachtungszeitraum über 24 Wochen.

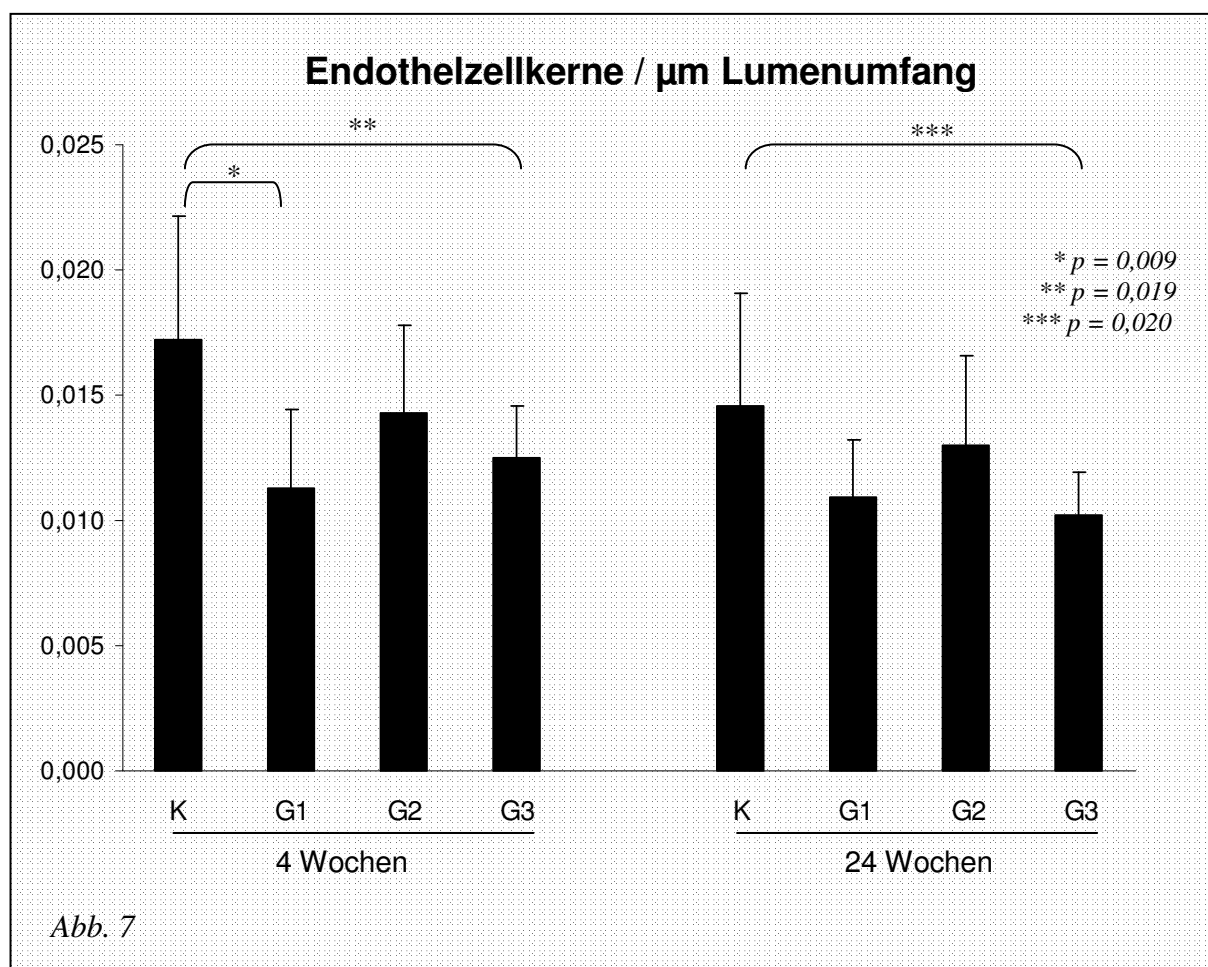


Abbildung 7 zeigt den Mittelwert der Endothelzellkern-Anzahl pro μm des umschlossenen Lumens der Aortenimplantate in den einzelnen Gruppen. Dabei findet sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der 4-wöchigen Kontrollgruppe mit den Gruppen G1 und G3 und in der 24-wöchigen Nachbeobachtungszeit zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe G3 im Mann-Whitney Rank Sum Test.

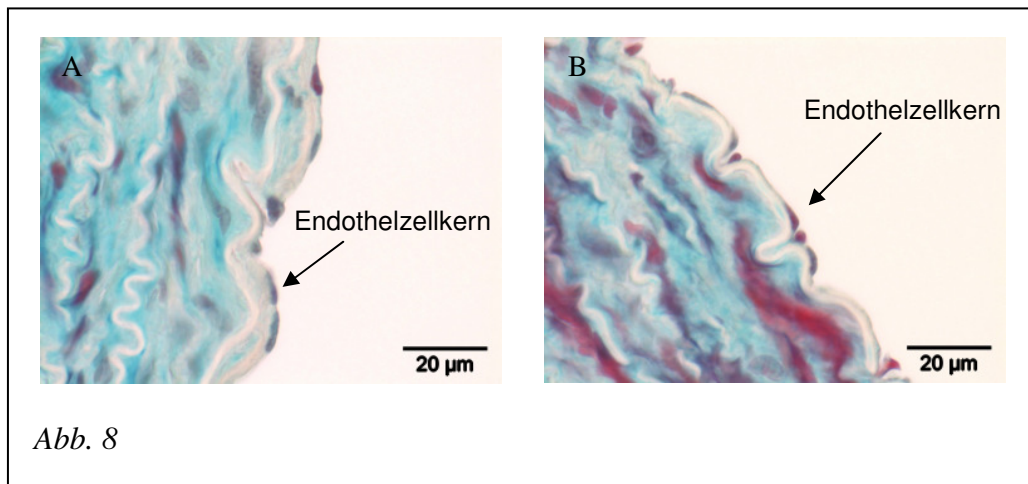


Abbildung 8 zeigt als Beispiel Endothelzellkerne eines Implantats aus der Kontrollgruppe nach 4 Wochen Implantationszeit (A). Das rechte Bild zeigt im Vergleich dazu Endothelzellkerne eines Implantats aus der Kontrollgruppe nach 24 Wochen Implantationszeit (B).

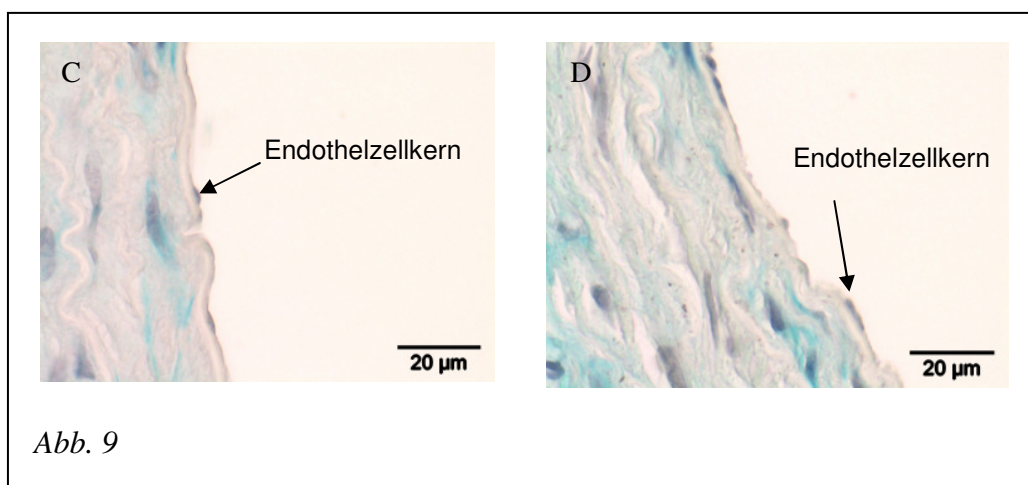


Abbildung 9 zeigt das Endothel eines Implantats der Gruppe G3 nach 4 Wochen Implantationszeit (C) und das Endothel eines Implantats der Gruppe G3 nach 24 Wochen Implantationszeit (D). Deutlich auffällig ist die geringere Anzahl von Endothelzellkernen beider Implantate im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abbildung 8 (A+B)).

3.3. Ausbildung von Anastomosen-Aneurysmata

Bei der Explantation der Implantate wurden zum Teil Aneurysmata an den Anastomosen gefunden. Dabei waren die Anzahl der Aneurysmata gleichmäßig auf proximale und distale Anastomosen verteilt. Es zeigte sich jedoch eine deutlich unterschiedliche Verteilung der Aneurysmata im Vergleich der einzelnen Gruppen. Am häufigsten traten Aneurysmata in den Kontrollgruppen auf. Wobei mit 30% diese am häufigsten in der 24 wöchigen Nachbeobachtungszeit auftraten. In der Gruppe G3 traten 10% Aneurysmen in beiden Nachbeobachtungszeiträumen auf. In der Gruppe G2 waren Aneurysmen nur in den 24 wöchigen Nachbeobachtungszeiten zu finden. Am besten schnitt die Gruppe G1 in beiden Nachbeobachtungszeiträumen mit DMSO 15% als alleinigen Kryoprotektor ab. Hier traten keine Aneurysmen an den Anastomosen auf.

Aneurysmen im Bereich der Implantate wurden in keiner der verschiedenen Gruppen beobachtet.

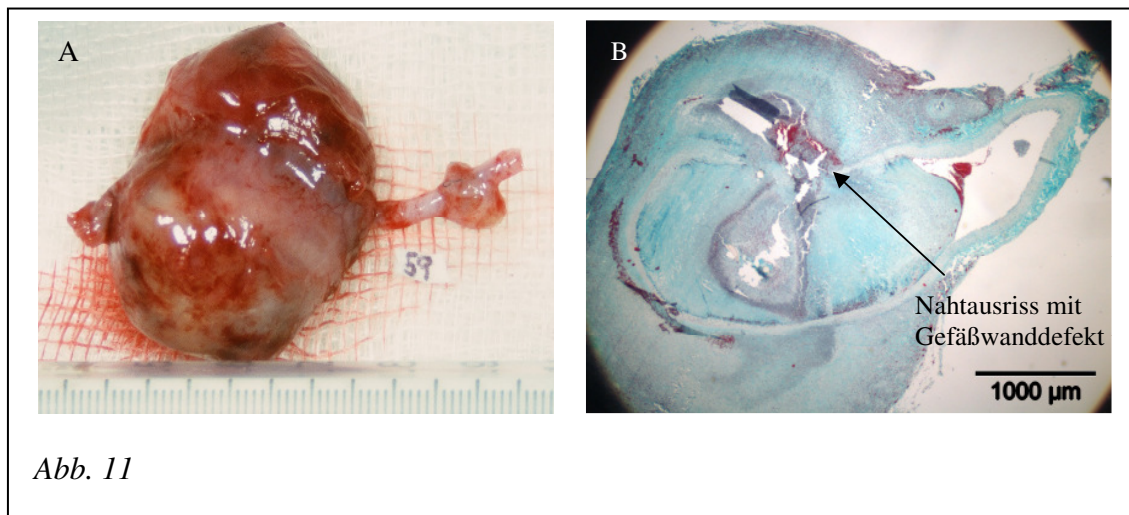


Abbildung 11 zeigt ein großes, distales Anastomosenaneurysma nach Explantation (A) und den histologischen Schnitt durch ein falsches Aneurysma mit Nahtausriß im teilthrombosierten Lumen (B).

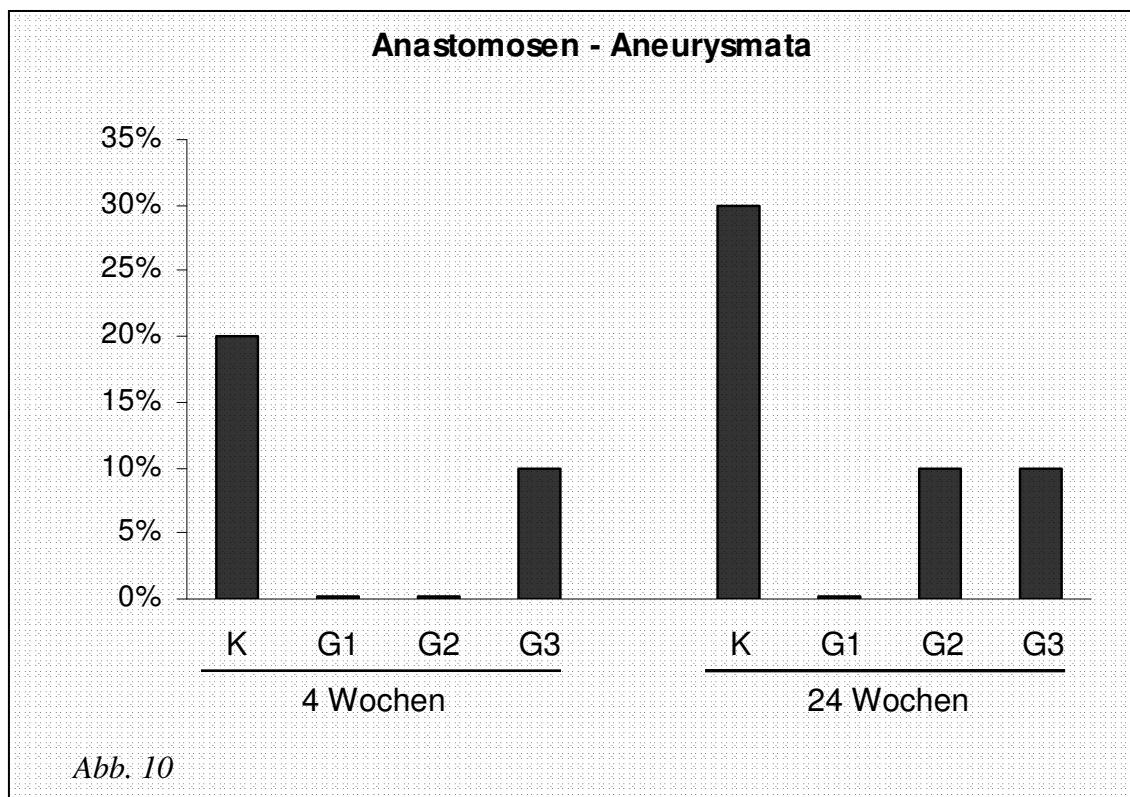


Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung der ausgebildeten Aneurysmen an den Gefäßanastomosen in den einzelnen Gruppen. Auffällig ist der deutlich höhere Anteil an Aneurysmen in den Kontrollgruppen.

3.4. Intimahyperplasie

3.4.1. Häufigkeit von Intimahyperplasien in den Gefäßtransplantaten

Zur Beurteilung der Veränderung der Gefäßtransplantate nach 4- bzw. 24-wöchiger Implantation wurde als Erstes die Anzahl des Auftretens einer Intimahyperplasie in den unterschiedlichen Gruppen untersucht. Dabei spielte es keine Rolle wie ausgeprägt die einzelne Intimahyperplasie in den einzelnen Gefäßen war, sondern es wurde lediglich untersucht, ob eine Hyperplasie der Intima vorlag oder nicht. Wie zu erwarten war, nahm das Auftreten einer Intimahyperplasie mit der Länge des Verbleibs in der Empfänger-Ratte zu.

Bei den ausgewerteten histologischen Schnitten zeigte sich in den Kontrollgruppen nach 4 Wochen und nach 24 Wochen bei keinem Implantat eine Intimahyperplasie.

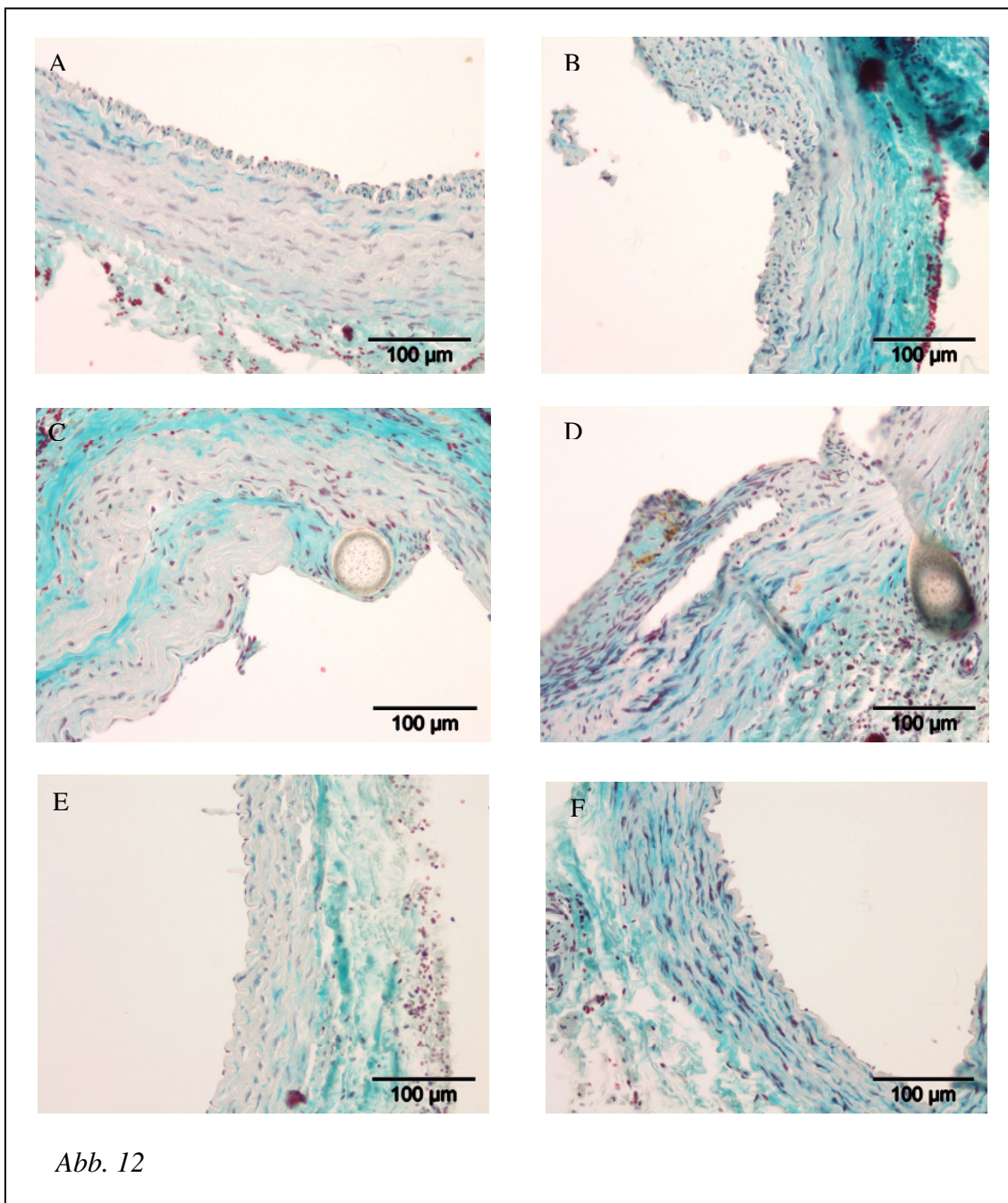


Abbildung 12 zeigt eine Intimahyperplasie im Bereich eines Implantats nach 4 Wochen (A) und eine Intimahyperplasie nach 24 Wochen Beobachtungszeit (B). Im Bild C und D ist je eine Intimahyperplasie im Bereich der Anastomose nach 4 und 24 Wochen Beobachtungszeit dargestellt. Die Bilder E und F zeigen Ausschnitte cranial der Anastomosen im empfangereigenen Aortenabschnitt jeweils ohne Intimahyperplasie.

Es fand sich in der Gruppe G1 mit 15% DMSO nach 4 Wochen in jedem zweiten Implantat eine Intimahyperplasie und nach 24 Wochen bei 71% eine Hyperplasie. Damit erbrachte diese Gruppe die schlechtesten Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von Intimahyperplasien in den Implantaten. Bei den Gruppen G2 und G3 zeigte sich ein prozentual selteneres Auftreten von Intimahyperplasien. Nach 4 Wochen entwickelte sich in der Gruppe G2 bei 40% eine Hyperplasie und nach 24 Wochen bei 55%; die Gruppe G3 brachte mit der Kombination der Protektoren von 15% DMSO und 2% CHSO die besten Ergebnisse. Hier zeigte sich nach 4 Wochen bei 30% und nach 24 Wochen bei 38% der Implantate eine Intimahyperplasie (*Abbildung 13*).

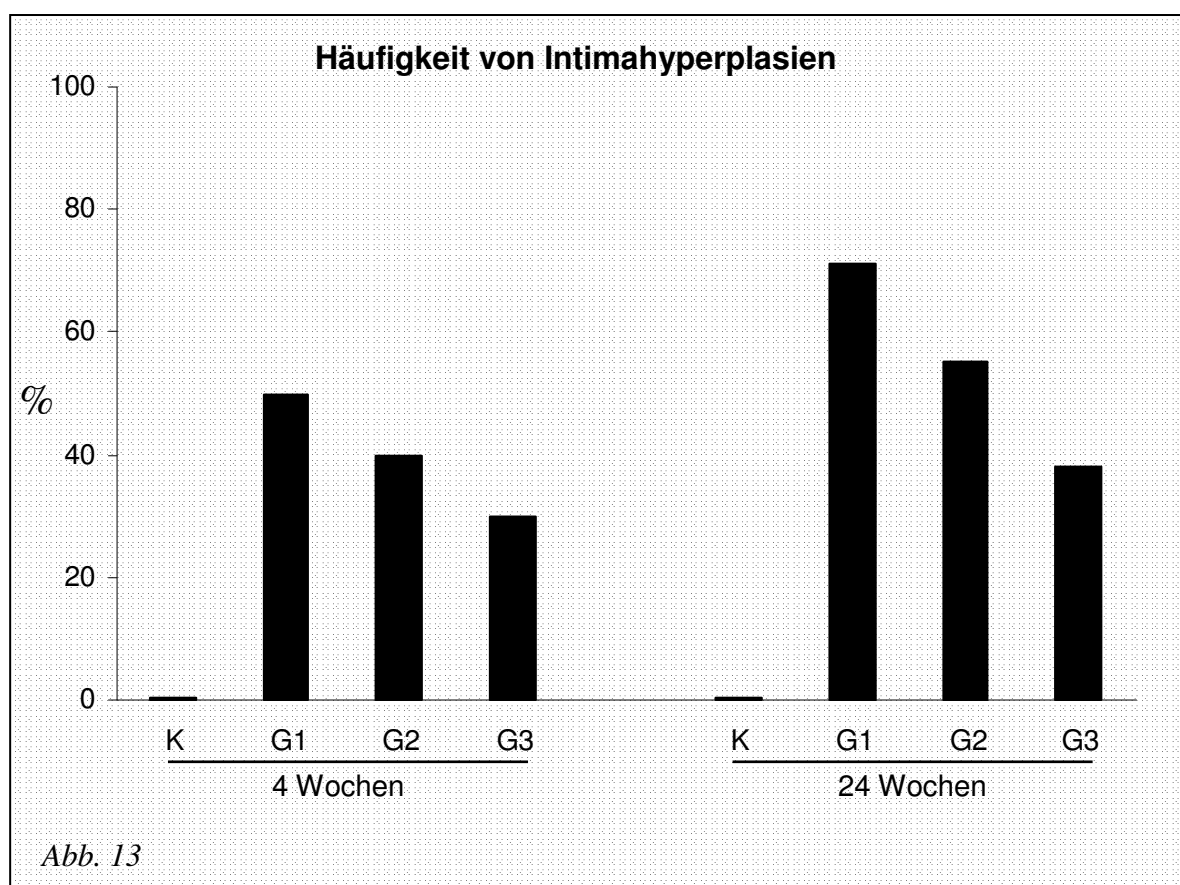


Abbildung 13 stellt die Häufigkeit von Intimahyperplasien in den transplantierten Aortengefäßen der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen dar.

Auffällig war, dass sich in allen untersuchten Gefäßen, in denen eine Intimahyperplasie auftrat, die Intimahyperplasie nur auf die Länge des Implantates beschränkte sowie im Anastomosenbereich zu finden war. Cranial und distal der Anastomosen fand sich keine Intimahyperplasie.

3.4.2. Ausdehnung der Intimahyperplasien

Im Weiteren wurde die flächenmäßige Ausdehnung der aufgetretenen Intimahyperplasien mit dem Computerprogramm ImageJ 1.40g in μm^2 vermessen und zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

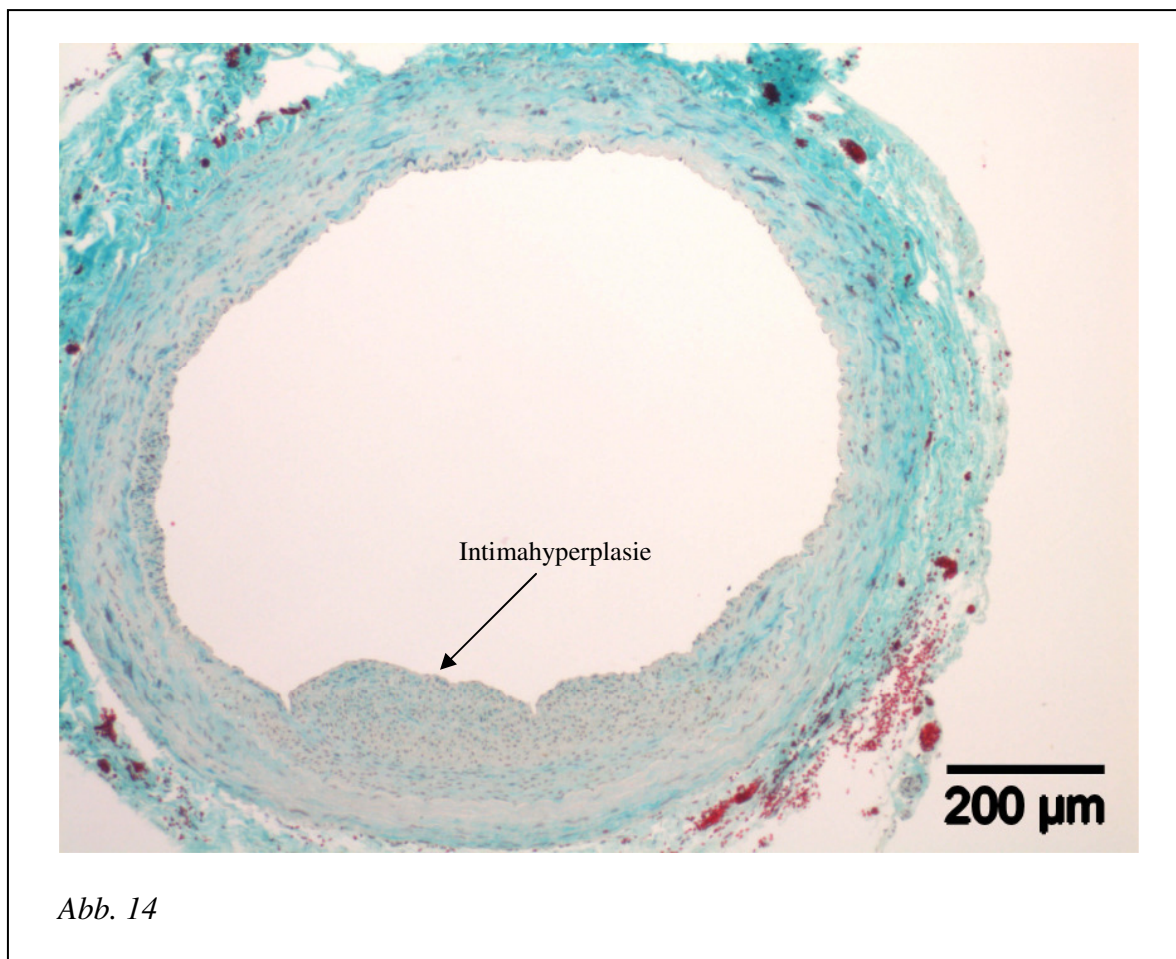


Abbildung 14 zeigt beispielhaft ein Transversalschnitt eines Aortentransplantates (24 Wochen) mit einer deutlichen Intimahyperplasie in der Trichrom-Färbung.

Die kräftigste Ausbildung von Intimahyperplasien zeigte sich dabei in dem Nachbeobachtungszeitraum über 4 Wochen in der Gruppe G1 mit 15% DMSO als alleinigen Kryoprotektor. Im Mittel bildete sich eine Intimahyperplasie über $77.087 \mu\text{m}^2$ aus. In den Gruppen G2 (10% DMSO + 2% CHSO) und G3 (15% DMSO + 2% CHSO) waren die Werte deutlich geringer. In der Gruppe G2 entwickelte sich eine Intimahyperplasie im Mittel über $37.652 \mu\text{m}^2$ und in der Gruppe G3 über $22.575 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe K zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Gruppen G1 und G2.

In den Gruppen über einen Nachbeobachtungszeitraum von 24 Wochen findet sich die deutlichste Intimahyperplasiebildung in der Gruppe G2 mit einem Mittel von $84.943 \mu\text{m}^2$. Die Gruppen G1 und G3 haben eine deutlich geringere Hyperplasie entwickelt. In der Gruppe G3 findet sich im Mittelwert eine Hyperplasie über $23.352 \mu\text{m}^2$ und in der Gruppe G1 ist Neigung zur Ausbildung einer Hyperplasie mit einem Mittel von $20.789 \mu\text{m}^2$ am geringsten. Der Mann-Whitney Rank Sum Test zeigt einen signifikanten Unterschied aller drei Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Abbildung 15*).

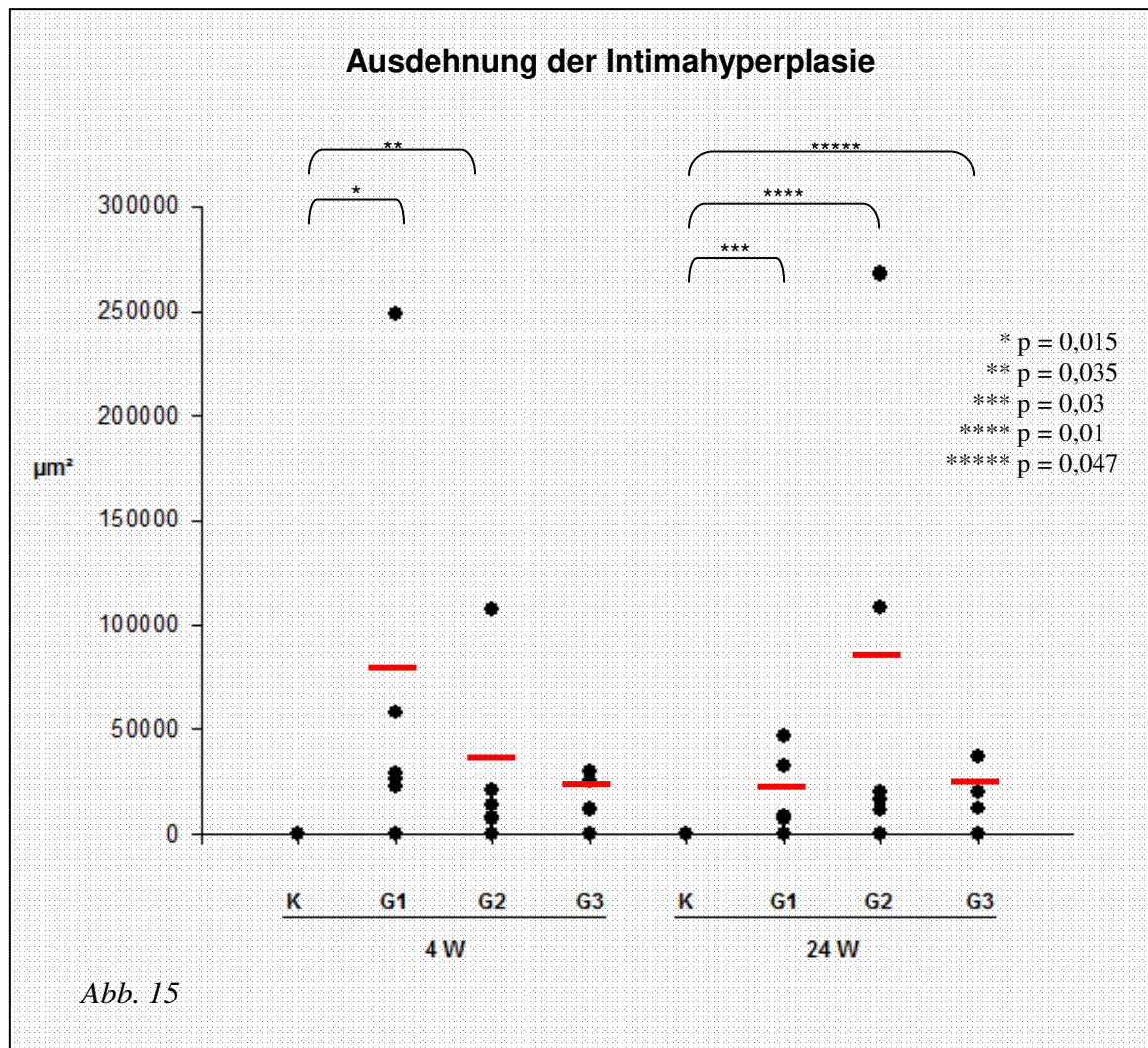


Abbildung 15 zeigt die unterschiedlich großen Intimahyperplasien der Implantate in μm^2 . Die roten Balken geben die Mittelwerte an.

3.4.3. Ratio der Intima-Media Fläche

Hier wurde die Fläche der Intima in μm^2 ausgemessen und ins Verhältnis zur gesamten Wandfläche (Intima+Media) gesetzt.

In der vierwöchigen Nachbeobachtungszeit zeigte sich in den Gruppen G1 mit einem Mittelwert von 0,1 und in der Gruppe G2 mit einem Mittelwert von 0,05 die größte Ratio. Die Gruppe G3 wies den kleinsten Mittelwert mit 0,02 auf. Im Mann-Whitney Rank Sum Test konnte nur ein signifikanter Unterschied der Gruppen G1 und G2 zur Kontrollgruppe dargestellt werden.

Die Verteilung in den Gruppen über 24 Wochen Nachbeobachtungszeit war etwas anders. Hier war der Mittelwert der Ratio der Gruppe G2 mit 0,09 am höchsten, in der Gruppe G1 betrug er 0,05 und in der Gruppe G3 0,03. Der Mann-Whitney Rank Sum Test konnte einen signifikanten Unterschied für alle drei Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (*Abbildung 16*).

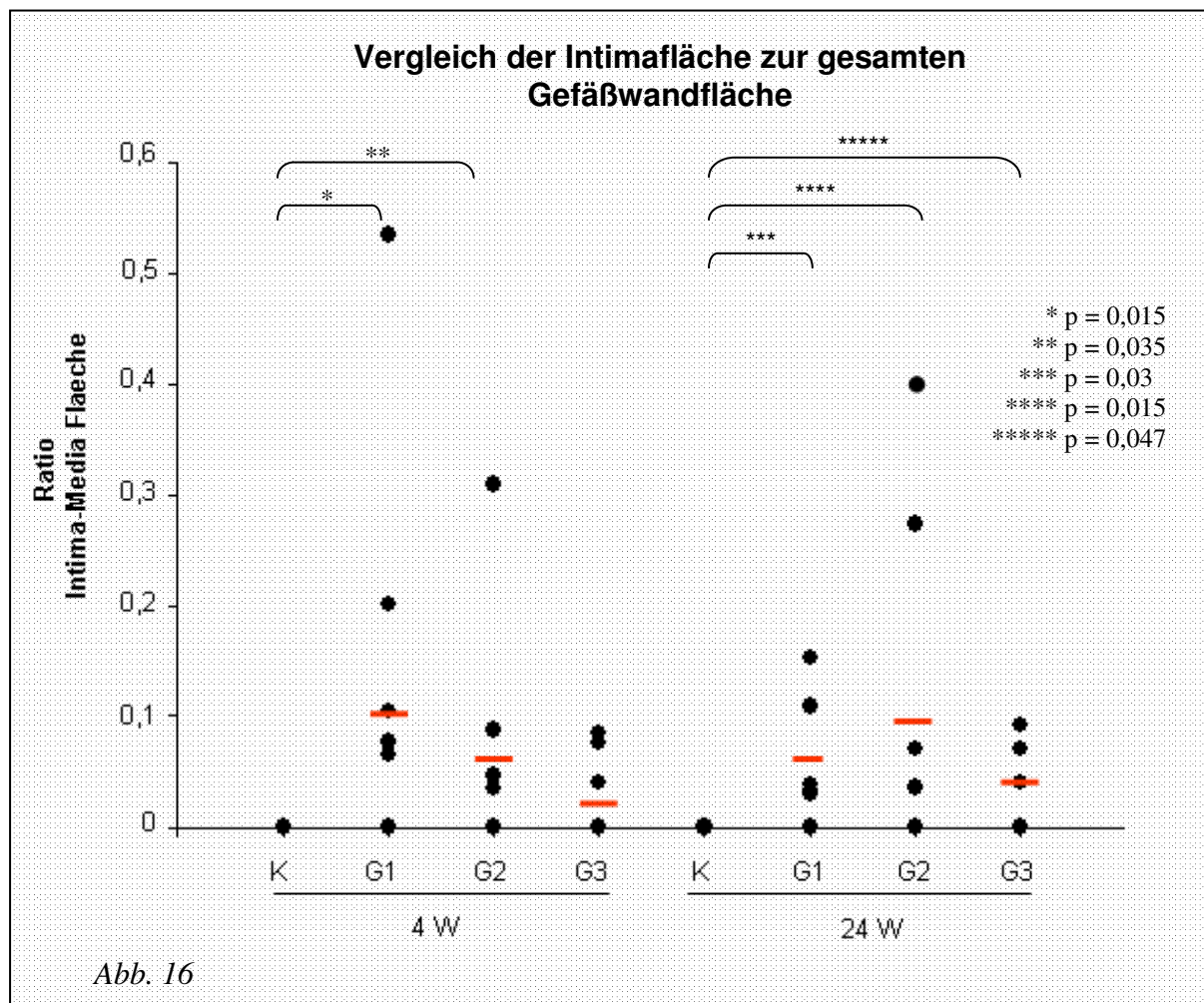


Abbildung 16 stellt das Verhältnis von Intima- zur gesamten Wandfläche (Intima+Media) dar. Hier ergeben sich nach dem Mann-Whitney Rank Sum Test die gleichen signifikanten Unterschiede, wie in der Abbildung 14 dargestellt. Die roten Balken geben die Mittelwerte an.

3.5. Funktionalität der Elastica-Fasern der Tunica media

Zur Beurteilung der elastischen Fasern der Tunica media wurde das Ausmaß der Schlängelung der Fasern bewertet.

Es erfolgte eine Einteilung in „schlecht“, „mäßig“, „gut“ und „sehr gut“ (*Tabelle 4*). Dabei wurde eine schlechte Schlängelung bzw. eine deutliche Streckung der Fasern einer schlechten Funktionalität gleichgesetzt und umgekehrt. Hierbei zeigten sich in den unterschiedlichen Gruppen Unterschiede, die sich in den 4 und 24 wöchigen Beobachtungszeiträumen aber nicht wesentlich zueinander veränderten.

Schlängelung der Elasticafasern	
Befund	Faserschlängelung (als Punktwert)
Sehr gut	3
gut	2
mäßig	1
schlecht	0

Tabelle 4

Tabelle 4 zeigt die semiquantitative Beurteilung der Elastica-Faserschlängelung als Punktwert.

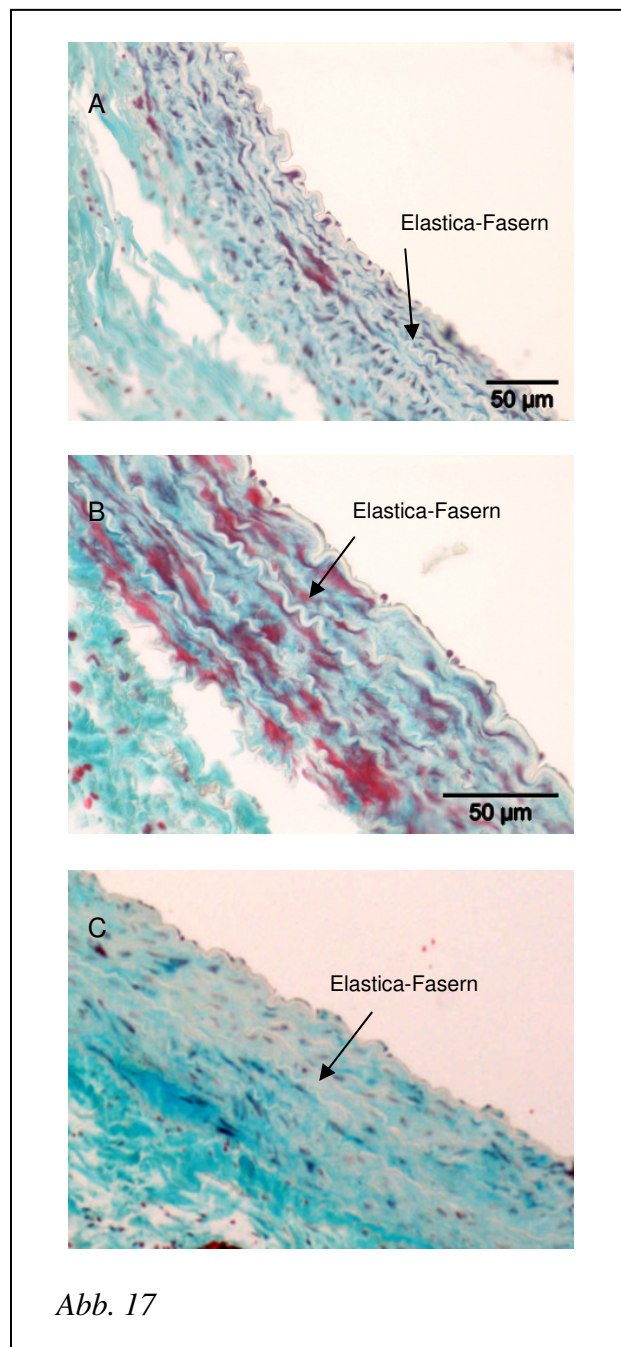


Abb. 17

Abbildung 17 zeigt Beispiele für die Schlängelung der elastischen Fasern. Bild A zeigt sehr gut erhaltene Elastica-Fasern im Bereich der ratteneigenen Aorta der Empfänger-Ratte aus der Kontrollgruppe (24Wochen) cranial der Implantat-Anastomose. Bild B zeigt ebenfalls sehr gut erhaltenen Elastica-Fasern im Bereich des Implantates aus der Kontrollgruppe (24Wochen). Bild C zeigt eine mäßige Schlängelung der Elastica-Fasern einer implantierten Aorta aus der Gruppe G3 (24 Wochen).

Die Kontrollgruppen wiesen in beiden Beobachtungszeiträumen dabei die beste Funktionalität bzw. Schlängelung der Elastica-Fasern von „gut“ bis „sehr gut“ auf. Die anderen Gruppen fallen dazu im Ergebnis ab. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wies die Gruppe G1 in beiden Beobachtungszeiträumen die beste Funktionalität mit überwiegend „guter“ Schlängelung auf. Die Gruppen G2 und G3 fallen diesbezüglich gleichmäßig im vierwöchigen Beobachtungszeitraum weiter ab. Die Schlängelung liegt bei „mäßig“ bis „gut“. Diese nimmt im vierundzwanzigwöchigen Beobachtungszeitraum noch weiter ab und das Ergebnis ist bei der Gruppe G2 dann am schlechtesten.

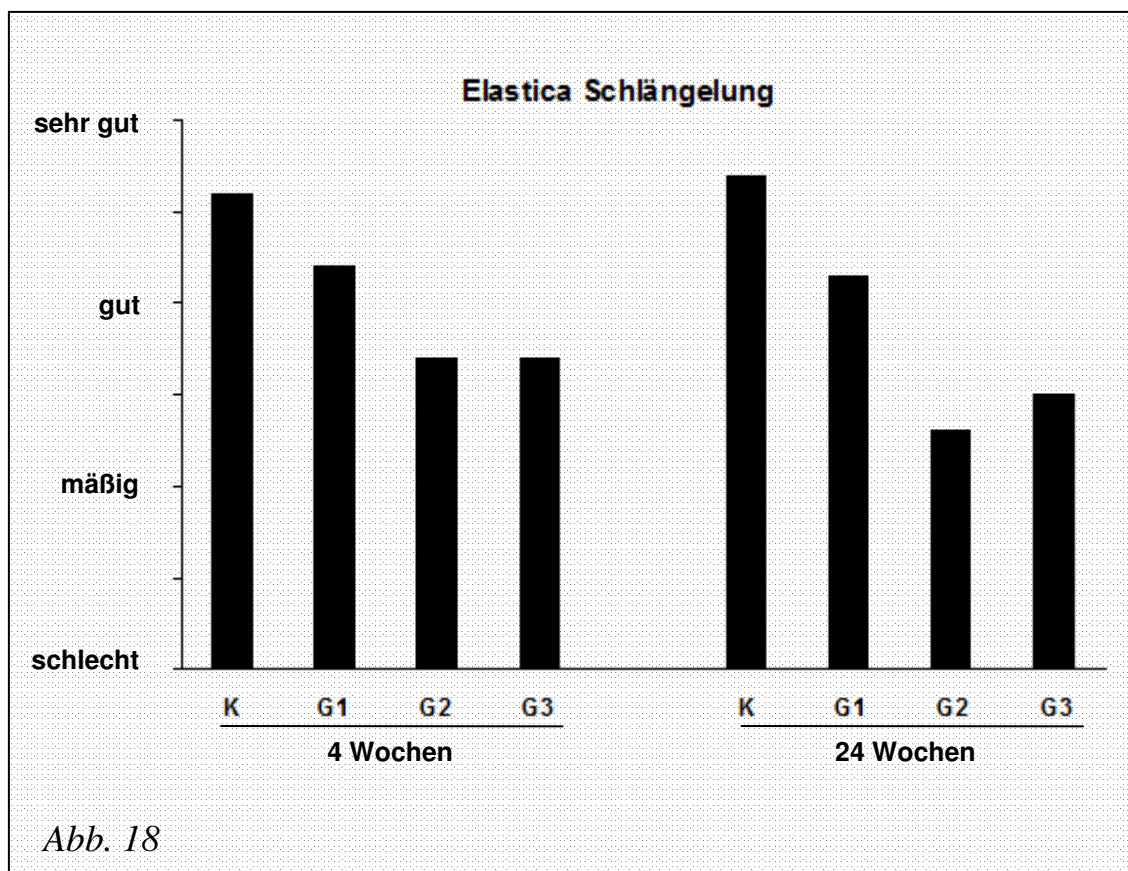


Abbildung 18 zeigt die semiquantitative Auswertung bezüglich der Schlängelung der Elastica-Fasern der Tunica Media als arithmetisches Mittel. Wobei eine stärkere Schlängelung einer besseren Funktionalität der Elastica-Fasern zugeordnet wurde.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse in diesem in-vivo Modell bezüglich der Erhaltung der einzelnen Wandschichten der Arterien durch die unterschiedlichen Kryoprotektoren während der Kryokonservierung werden zunächst einzeln betrachtet.

Untersucht wurde die Veränderung der Anzahl Endothelzellen pro μm Lumenumfang im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Das beste Ergebnis wird hier in der Gruppe G2 durch die Kombination von DMSO 10% und CHSO 2% erreicht. Das gilt sowohl für den Beobachtungszeitraum über 4 als auch über 24 Wochen. Die Gruppe G1 und die Gruppe G3 mit dem Kryoprotektor DMSO 15% bzw. in Kombination mit CHSO 2% schneiden im Vergleich etwa gleichmäßig schlechter ab.

Das Auftreten von Aneurysmata trat in der Gruppe G1 mit DMSO 15% als alleinigen Kryoprotektor in beiden Beobachtungszeiträumen gar nicht auf und zeigt damit die besten Ergebnisse im Gruppenvergleich. Die Gruppen G2 und G3 entwickelten sich etwa gleich häufig Aneurysmen und bei den Kontrollgruppen zeigten sich die meisten Aneurysmen.

Das Auftreten von Intimahyperplasien ist in der Gruppe G3 bei der Kombination der Kryoprotektoren DMSO 15% und CHSO 2% am seltensten. Am häufigsten findet man die Intimahyperplasie in der Gruppe G1 mit DMSO 15% als alleinigen Kryoprotektor. Dies gilt für beide Beobachtungszeiträume, wobei die Häufigkeit der Intimahyperplasien mit der Länge der Nachbeobachtungszeit in allen Gruppen gleichmäßig zunimmt.

Die Ausdehnung der aufgetretenen Intimahyperplasien ist bei der Gruppe G3 am geringsten insbesondere nach 4 Wochen Beobachtungszeit, nach 24 Wochen in der Gruppe G1 und G3. Am ausgeprägtesten ist die Intimahyperplasie in der 4 wöchigen Beobachtungszeit in der Gruppe G1 und nach 24 Wochen in der Gruppe G2. Gleiches gilt für die Ratio, also die Ausdehnung der Intimahyperplasie im Vergleich zur gesamten Querschnittsfläche der Gefäßwand.

Als Maß für die Intaktheit der Media wurde die Schlängelung der Elastica-Fasern beurteilt. Die besten Ergebnisse erzielt hier die Gruppe G1 mit dem einzelnen Kryoprotektor DMSO 15%. Die unterschiedlichen Kombinationen der Kryoprotektoren DMSO und CHSO in den Gruppen G2 und G3 fallen in Bezug auf den Erhalt der Elastica-Fasern in etwa gleichmäßig in beiden Nachbeobachtungszeiträumen ab.

Betrachtet man alle Ergebnisse zusammen, so ergibt sich der beste Erhalt der Endothelzellen in der Gruppe G2. Die beste Konservierung in Bezug auf die Häufigkeit von Intimahyperplasien und ihrer Ausdehnung im Vergleich zum gesamten Gefäßwandquerschnitt findet sich in der Gruppe G3 mit einer Kombination von 15% DMSO und 2% CHSO.

Der Erhalt der Elastica-Fasern und des Endothels gelang jedoch am besten in der Gruppe G1 mit dem einzelnen Kryoprotektor DMSO in 15% Konzentration.

Am gleichmäßigsten erhielt die Kombination von 15% DMSO und 2% CHSO der Gruppe G3 die Wandschichten der Arterien.

5. Diskussion

Die Bypassoperation hat in der Behandlung von Gefäßverschlüssen inzwischen einen festen Stellenwert in der Medizin. Sie wird eingesetzt, wenn konservative Maßnahmen zur Verbesserung der Durchblutung vom Herzen oder Extremitäten nicht mehr ausreichend sind. Dabei nimmt die Anzahl der Patienten, die eine operative Versorgung mittels Bypass benötigen, weiter zu (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information 2009).

Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von eigenen Gefäßen, sowohl Arterien als auch Venen, den künstlichen Gefäßprothesen, insbesondere von Prothesen mit einem Durchmesser unter 6mm, überlegen sind (Klinkert et al. 2004 und 2003; Lang et al. 2001; Jackson 2000).

Häufig müssen jedoch Prothesen eingesetzt werden, da keine patienteneigenen Venen oder Arterien zur Verfügung stehen.

Ziel wäre es hier Gefäßbanken zu errichten, in denen allogene Gefäße zeitlich unbegrenzt gelagert werden können, um so bei Bypassoperationen die Nachteile der alloplastischen Gefäßprothesen zu umgehen und die Vorteile der allogenen Gefäße zu nutzen. Hierbei bedarf es jedoch noch intensiver Forschung, um eine Technik der Kryopräservierung zu entwickeln, die die Struktur und Funktion der Gefäße weitestgehend erhält.

In der eigenen Untersuchung sollte geprüft werden, ob die Kryoprotektoren, die zuvor in einer Arbeit von C. Schmidt 1998 im in-vitro Tiermodell gute Ergebnisse bezüglich des Erhalts der Gefäßstrukturen von infrarenalen Aortensegmenten erzielten, diese auch im in-vivo Tiermodell erreichen.

Kryopräservierung kann eine Zellschädigung des eingefrorenen Gewebes verursachen. Diese wird durch drei wesentliche Schritte bei der Kryopräservierung beeinflusst. Dabei handelt es sich um den Einfrierprozess, den Auftauprozess und zusätzlich um das Medium, in dem das zu konservierende Gewebe eingefroren wird. Jeder Zelltyp hat dabei unterschiedliche Optima, was den Prozess des Einfrierens, des Auftauens und bezüglich des Mediums, in dem dieser konserviert werden soll, betrifft.

Da ein Gewebeverband im Allgemeinen aus unterschiedlichen Zelltypen besteht, muss daher immer ein Kompromiss bei den einzelnen Schritten der Kryokonservierung und dem Medium eingegangen werden. Eine optimale Gefrieremethode kann daher nicht für alle im selben Gewebe vorhandenen Zellen existieren (Wustemann 2001; Vannereau et al 1998; Müller-Schweinitzer 1991; Bank und Brockbank 1987; Pegg 1985).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Kühlrate, also das Abfallen der Temperatur innerhalb eines Zeitraumes, und die Geschwindigkeit des Auftauens von großer Bedeutung sind bezüglich des Erhaltes der Viabilität und der Zellfunktion. Ein zu schneller Einfrierungsprozess führt zu mechanischen Alterationen der Zellstrukturen und ein zu langsamer zu zelltoxischen Salzkonzentrationen (Mazur et al. 1972).

Zur Klärung der optimalen Kühlrate wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Die optimale Kühlrate hängt dabei sehr von der Beschaffenheit und von der Größe des Gewebes ab. So konnte ein maximaler Erhalt von vasculären Endothelzellen bei einer Kühlrate zwischen 0,3°C/min und 10°C/min gezeigt werden (Pegg 2002).

Dies galt allerdings für Zellkulturen von Endothelzellen. Bei arteriellen Gefäßen schwankte die optimale Kühlrate zwischen 0,69°C/min und 1,6°C/min (Rendal et al. 2004; Stanke et al. 1998; Song et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde das Einfrierprogramm von Weers (1995) modifiziert für Rattengefäße übernommen aus der Arbeit von Schmidt 1998. Es resultiert hier eine Kühlrate von 1,33°C/min.

Der Prozess des Auftauens ist ebenfalls ein wichtiger Faktor im Funktionserhalt des konservierten Gewebes. Während des Erwärmungsprozesses können sich große Eiskristalle bilden, die die Zellstrukturen schädigen und auch zu makroskopischen Geweberissen führen (Bujàn et al. 2000; Ashwood-Smith/ Farrant 1980)

Hierbei zeigte sich, dass ein langsames Auftauen eine geringere Gewebsschädigung hervorruft (Müller-Schweinitzer 2007; Rendal et al. 2004; Gemma et al. 2004; Bujàn 2001; Pegg 1997).

In diesen Versuchen erfolgte nach Entnahme der Gefäße aus dem Lagerungstank ebenfalls eine langsame Erwärmung. Es zeigten sich so keine Geweberisse in den histologischen Schnitten.

Der dritte Faktor, der die Kryopräservierung beeinflusst, ist das Medium, in dem das Gewebe konserviert werden soll. In dieser Arbeit wurden die Kryoprotektoren ausgesucht, die in der Arbeit von Schmidt 1998 im in-vitro Modell zum Erhalt der Gefäßwandstrukturen von Arterien, die besten Ergebnisse zeigten. Hierbei handelte es sich um die Kryoprotektoren Dimethylsulfoxid als alleinigen Kryoprotektor und bzw. in Kombination mit Chondroitinsulfat. Diese waren aufgrund von früheren Forschungsarbeiten ausgewählt worden (Müller-Schweinitzer 1991, O'Brien et al 1987).

Dimethylsulfoxid wurde vor über fünfzig Jahren erstmals als Kryoprotektor eingesetzt. Er hat sich inzwischen zu dem am häufigsten eingesetzten Protektor, meist in Kombination mit fetalem Kälberserum, bei Gefrierkonservierung lebender Zellen und Gewebe entwickelt. Es zeigte sich, dass in Gegenwart von DMSO der Erhalt von glatten Muskelzellen deutlich erhöht werden kann. Die Kontraktionskraft der glatten Muskelzellen war deutlich stärker unter DMSO, als bei Kryoprotektoren wie Glycerol, Polyethylenglycol 400 oder H-Methyl- und Dimethylformamid (Müller-Schweinitzer 1991).

Die mechanischen Eigenschaften des Kollagens und der elastischen Fasern in Venen konnten durch Kryokonservierung mit DMSO verbessert werden. Auch die endothelunabhängige Relaxation auf Substanzen wie Prostacyclin und Nitroprussid konnte durch DMSO und fetalem Kälberserum bei Kryopräservierung von Arterien verschiedener Spezies erhalten werden.

Dabei wurde gezeigt, dass seine Konzentration von 10% bzw. 15% DMSO am effektivsten ist (Schoeffter und Müller-Schweinitzer 1990).

Auf Chondroitinsulfat, als extrazellulären Kryoprotektor, wurde zurückgegriffen aufgrund von Experimenten zur Kryokonservierung von Hornhäuten durch Böhnke, Hagenah und Draeger 1987, deren guten Ergebnisse in weiteren Studien, insbesondere in Kombination der Kryoprotektoren DMSO und Chondroitinsulfat, bestätigt wurden (Wu et al. 2007; Huang Ting et al. 1998; Böhnke et al 1987).

5.1. Erhalt von Endothelzellen

Einen entscheidenden Anteil an der Funktion der Gefäßwand hat das Endothel. Es reguliert die Gefäßweite und somit das Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff in den nachgeschalteten Organen und den Extremitäten. Es ist aber zusätzlich auch noch an vielen anderen Gefäßfunktionen beteiligt. So steuert es auch die Blutgerinnung, die Migration von Abwehrzellen und das Zellwachstum der glatten Muskulatur der Gefäßwand.

Bei der Untersuchung der Endothelzellen in dieser Arbeit fand sich ein Abfall der Endothelzellkernzahl durch die Kryopräservierung in allen Beobachtungsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Signifikant gegenüber der Kontrollgruppe war dieser in den Gruppen G1 (15% DMSO) und G3 (15% DMSO + 2% CHSO) nach 4 Wochen und in der Gruppe G3 nach 24 Wochen. Der relative Abfall der Zellkernzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Beobachtungszeitraumes entsprach für die Gruppe G1 36% (4 Wochen) und 22% (24 Wochen), G2 18% und 8% und bei der Gruppe G3 30% und 29%.

Diese Werte im in-vivo Modell bestätigen in etwa die Ergebnisse der Untersuchung von Schmidt 1998 im in-vitro Modell, bei der es zu einem relativen Abfall der Zellkernzahl um ca. 25% gegenüber der Kontrollgruppe kam. In der Gruppe G2 zeigt sich in diesem in-vivo Modell sogar ein besseres Ergebnis mit einer höheren Anzahl von erhaltenen Endothelzellen.

Die Endothelialisierungsrate war bei der Arbeit von Schmidt in der Gruppe mit einer Kombination von 10% DMSO und 2% CHSO am höchsten. Im in-vivo Modell dieser Arbeit ist die Zellkernanzahl in der Gruppe mit dieser Kombination der Kryoprotektoren ebenfalls am höchsten. Auch in anderen Studien findet sich der beste Erhalt von Endothelzellen, wenn eine Kombination von DMSO und Chondroitinsulfat eingesetzt wird (Wu et al 2007; Huang Ting 1998).

Insgesamt findet sich jedoch eine durchschnittlich niedrigere Gesamt-Zellkernzahl im Vergleich zur in-vitro Untersuchung von Schmidt. Eine deutliche Reduzierung der Endothelzellen nach Kryopräservierung wurde in anderen Arbeiten, sowohl in-vitro- als auch in in-vivo Modellen, beobachtet. Dass die Endothelzellanzahl nach Implantation weiter abfällt, ist vermutlich auf ein immunologisches Geschehen zurückzuführen (Saito et al. 2006; Bambang et al. 1995).

Eines der Hauptprobleme bei Transplantationen sind die zelleigenen Oberflächenantigene des Spendergewebes, hauptsächlich vertreten durch die in der Zellwand liegenden Major Histocompatibility Komplexe (MHC I) aller kernhaltiger Zellen, die nicht identisch zu denen des Empfängers sind. Empfängereigene T-Zellen reagieren mit diesen fremden Oberflächenantigenen und können so eine hyperakute Abstoßungsreaktion auslösen mit einem schnellen Versagen des Transplantates (Host-versus-Graft-Reaktion).

Als Ursache für die Abnahme der Endothelzellzahl wird zusätzlich die Zelldehydration während des Einfrierprozesses diskutiert. Es wird dabei angenommen, dass die Zelldehydration starken mechanischen Stress auf die Zellwand ausübt und die Adhäsionsproteine dabei geschädigt werden. Die Zellen verlieren untereinander den Halt und werden insbesondere durch Scherkräfte im Gefäß gelöst (Zhang et al 2006).

Dass es zu einem besseren Erhalt von Endothelzellen kommt, wenn neben DMSO der extrazellulär wirkende Kryoprotektor CHSO eingesetzt wird, könnte an der anti-inflammatorischen Wirkung von CHSO liegen. Klinische Studien haben gezeigt, dass CHSO die Chemotaxis von Entzündungszellen sowie deren Phagozytoseaktivität senkt. Zudem werden unter CHSO weniger Lysozyme freigesetzt, die die Zellwände schädigen können (Ronca et al. 1998).

Warum die Anzahl der Endothelzellkerne in der Kontrollgruppe über einen Nachbeobachtungszeitraum von 24 Wochen relativ zu den Versuchsgruppen stärker abfällt, kann vielleicht durch die erhöhte Antigenität der frischen Allotransplantate erklärt werden.

In einer Arbeit von Yu et al. zeigte sich, dass Osteoblasten nach Kryopreservation eine deutlich geringere Expression des MHC I mit einer signifikant geringeren Immunogenität zeigen als frische Osteoblasten. Zusätzlich finden sich Arbeiten, bei denen es zu einer Degeneration der antigen-presentierenden T-Zellen (CD4-Zellen) im transplantierten Gewebe nach Kryopreservation kam und somit eine geringere Immunantwort im Sinne einer Graft-versus-Host-Reaktion auslöste (Wingenfeld et al. 2002, Abe et al. 1995). In einer Arbeit von Gu et al. 2004 fand sich ebenfalls ein Abfall von CD4-Zellen und von phagozytose-vermittelnden Antigenen auf den Zellwänden.

Es finden sich aber auch gegensätzliche Ergebnisse in der Literatur. So konnte in einer Untersuchung von Dhesi et al. 1993 kein Unterschied bezüglich der Expression des MHC I und MHC II Antigen zwischen kryopräservierten und frischen Endothelzellen von Venen festgestellt werden.

Ob das Endothel aller transplantierten Gefäße dem Ursprungsendothel entspricht oder durch Empfänger eigene Endothelzellen größten Teils ersetzt wurde, ist unklar. Showalter et al. konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass nach neun Monaten es zu einem Wiederanstieg der Endothelzellzahl kam (Showalter et al. 1989).

Es wurde jedoch nicht untersucht, ob diese Zellen durch empfängereigene Zellen ersetzt wurden oder es zu einer Zellteilung der grafteigenen Endothelzellen kam. Vischjager et al. 1996 konnte bei Gefäßtransplantationen zeigen, dass es zu einem Ersatz der glatten Muskelzellen der Gefäßwand des Grafts durch empfängereigene Zellen kommen kann (Vischjager et al. 1996).

5.2. Ausbildung von Aneurysmata

Zusätzlich zu den beobachteten und untersuchten Veränderungen der Gefäßwände im in-vitro Modell, konnte im in-vivo Modell die Ausbildung von Aneurysmen im Anastomosenbereich beobachtet werden. Diese traten mit 30% am häufigsten in der Kontrollgruppe über 24 Wochen Nachbeobachtung auf. Seltener traten solche Aneurysmen in den Gruppen G 2 und G3 auf. In der Gruppe G 1 wurden keine Aneurysmen beobachtet, sodass DMSO, eingesetzt als alleiniger Kryoprotektor, das beste Ergebnis in dieser Untersuchung erzielt.

Bei allen Aneurysmen handelte es sich um falsche Aneurysmen mit Ausriss der Naht aus der Gefäßwand.

Warum es zu falschen Aneurysmen kommen kann, wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. So wurden falsche Aneurysmen durch fehlerhaftes Nahtmaterial und durch Ausrisse des Nahtmaterials aus den Gefäßwänden beobachtet. Aber auch Infektionen werden als Gründe aufgeführt, insbesondere bei früh postoperativ aufgetretenen Aneurysmen (Gaylis H und Deware G. 1990).

Wo hingegen Moore und Hall 1970 Infektionen bei den untersuchten Anastomosenaneurysmen ihrer Arbeit nicht feststellen konnten. Sie vermuteten die Ursachen falscher Aneurysmen in mechanischer Belastung der Anastomosen und besonders in fehlerhaftem Nahtmaterial, das damals jedoch noch aus Seide bestand und heute nicht mehr eingesetzt wird.

Die Ausbildung von Aneurysmata wurde auch gehäuft bei Bluthochdruck und bei Gefäßerkrankungen beobachtet, die generalisiert auftreten (Mehr-Etagen-Typ) (van den Akker PJ und Brand R 1989).

Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass in den Bereichen der Anastomosen ein erhöhter Endothelschaden durch die mechanischen Belastungen von Scheren, Skalpell und Nahtmaterial vorliegt und damit als Auslöser von Aneurysmen mitbeteiligt ist. Auch die nicht hundertprozentig aneinanderliegenden Abschnitte der Tunica media vom Spendergefäß zum Empfängergefäß können eine erhöhte Immunantwort mit nachfolgender Aneurysmbildung auslösen.

Bei Gefäßtransplantationen mit frischen Allografts fand man eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten im Bereich der Intima bei Ausbildung von Aneurysmata. Insgesamt traten die Aneurysmata häufiger bei frischen Allografts auf als bei kryopräservierten Allografts. Die histologischen Untersuchungen zeigten bei kryopräservierten Allografts auch eine geringere Anzahl von T-Lymphozyten, sodass man davon ausgeht, dass durch die Kryopräservierung die Antigenität der Allografts und die entsprechende Immunantwort des Empfängers herabgesetzt wird, was auch in vielen weiteren Arbeiten bestätigt wird (Solanés et al. 2004; Gu et al. 2004; Wingenfeld 2002).

Die Ergebnisse von Solanés et al 2004 finden sich in dieser Arbeit bestätigt. Es zeigten sich in dieser Arbeit ebenfalls häufiger Aneurysmata in der Gruppe mit frisch transplantierten Allografts.

Ob die Nahtausrisse und die nachfolgenden Aneurysmaausbildungen durch eine Entzündungsreaktion, fehlerhaftes Nahtmaterial, erhöhte mechanische Belastung oder unzureichende Nahttechnik bedingt wurden, bleibt zu diskutieren. Eine erhöhte Aktivität von T-Lymphozyten könnte auch erst sekundär durch das Auftreten eines falschen Aneurysmas denkbar sein.

5.3. Ausbildung von Intimahyperplasien

Im Vergleich zum in-vitro Modell der Arbeit von Schmidt 1998 wurde zusätzlich die Ausbildung von Intimahyperplasien untersucht. Intimahyperplasien in Gefäßen werden auch durch Defekte am Endothel verursacht. Diese können schon bei der Präparation der Gefäße von Spendern verursacht werden, aber auch durch die Technik der Kryokonservierung und der Implantation.

Zusätzlich entstehen Endotheldefekte durch die Immunantwort des Empfängers auf die fremden Gewebezellen. Bei Defekten im Endothel kommt es zu einer Reihe von Mechanismen, die eine Intimahyperplasie und Stenose des Gefäßes nach sich ziehen können. So kommt es zunächst zur Adhäsion von Thrombozyten und Immunzellen an der defekten Gefäßwand (Wilentz et al. 1987). Immunzellen und zerstörte Gefäßzellen setzen Wachstumsfaktoren frei.

Auch die Bildung von Prostacyclin und Stickstoffmonoxid ist vermindert, die antiinflammatorisch und antiproliferativ wirken. So können vermehrt immunkompetente Abwehrzellen in die Media einwandern, was die Migration glatter Muskelzellen wiederum beschleunigt (Rahmani et al. 2006; Baron et al. 2004; Koglin 2000; Randone et al. 1998; Chen et al. 1997; Sterpetti et al. 1996).

Es gibt neben den alloantigen-bedingten Ursachen für Intimahyperplasien auch davon unabhängige Faktoren, wie vorbestehende Gefäßerkrankungen des Empfängers, virale Infektionen, Bluthochdruck, Hyperlipidämie oder Glucosestoffwechselstörungen.

In den eigenen Ergebnissen finden sich keine Intimahyperplasien in den Kontrollgruppen mit frischen Allografts. Dies liegt sicherlich auch an dem weitestgehend intakten Endothel der frischen Transplantate. In der Arbeit von Schmidt 1998 zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen von frisch explantierten Aorten eine glatte Endotheloberfläche ohne Löcher zwischen den Zellen. In den kryokonservierten Gefäßen fanden sich hingegen größere Endotheldefekte zwischen den Zellen mit Unregelmäßigkeiten der stromlinienförmigen Endotheloberfläche.

Dass keine Intimahyperplasien in den Kontrollgruppen beobachtet wurden, liegt zudem sicherlich auch an der Tatsache, dass die Spender und Empfänger vom gleichen Rattenstamm waren, sodass eine höhere Immuntoleranz bestand. Andere Untersuchungen, bei denen Gefäßtransplantationen mit frischen Allografts zwischen unterschiedlichen Rattenstämmen durchgeführt wurden, zeigen auch bei frischen Allografts Intimahyperplasien, wenn auch nicht so ausgeprägt, wie bei kryopräservierten Gefäßen (Motomura et al. 1995).

In den anderen Beobachtungsgruppen dieser Untersuchung finden sich Intimahyperplasien in unterschiedlich starker Ausbildung und Häufigkeit. Die Intimahyperplasien wurden dabei nur im Implantatbereich und an den Anastomosen beobachtet. Direkt proximal und distal der Anastomosen fanden sich keine Intimahyperplasien mehr. Dass die Intimahyperplasien sich ausschließlich auf die Transplantate beschränken, wurde schon bei anderen Arbeiten beobachtet und spricht für eine immunologische Ursache (Wagner et al. 1995).

Die Häufigkeit der beobachteten Intimahyperplasien in den einzelnen Gruppen nimmt mit der Implantationsdauer zu. Auch diese Zunahme von Intimahyperplasien im Laufe der Zeit nach Implantation von Bypässen aller Art, haben schon mehrere klinische Studien gezeigt. Diese treten dabei meist in relevanter Form im Bereich der Anastomosen auf.

Nahtmaterial und unregelmäßige Übergänge der Gefäßwand des Empfängers zum Transplantat – insbesondere End-zu-Seit Anastomosen mit erhöhter Anastomosenspannung - verändern den linearen Blutfluss und damit die Scherkräfte am Endothel. Es resultiert ein lokaler Gefäßwandschaden mit folgender Intimahyperplasie (Rückert RI 2001; Ballyk PD et al. 1997; Bassiouny et al. 1992).

In der Gruppe G3 traten Intimahyperplasien am seltensten auf und nahmen im Vergleich zu den anderen Gruppen auch in der Häufigkeit über die Beobachtungszeit weniger zu. Die Kombination der Kryoprotektoren aus 15% DMSO und 2% CHSO (G3) bildet den besten Schutz vor Intimahyperplasien. Der alleinige Einsatz von 15% DMSO (G1) als Kryoprotektor schneidet hier am schlechtesten ab.

Bei den oben beschriebenen Pathomechanismen zur Ausbildung von Intimahyperplasien liegt der Schluss nahe, dass man in der Gruppe G1 auch den geringsten Erhalt von Endothelzellen erwarten würde, wenn diese am häufigsten Intimahyperplasien ausbildet. Dies trifft in den Ergebnissen dieser Arbeit auch zu.

In dieses Schema passt allerdings nicht das Ergebnis der Gruppe G3, die in beiden Beobachtungszeiträumen, ebenso wie die Gruppe G1, einen signifikant schlechteren Erhalt von Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufweist. Hier würde man folglich erwarten, dass auch eine erhöhte Rate von Intimahyperplasien zu beobachten wäre. Es zeigte sich jedoch das Gegenteil. Diese Gruppe entwickelte am seltensten Intimahyperplasien. Sollten sich diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigen, so muss man vermuten, dass noch andere Faktoren eine Intimahyperplasie begünstigen bzw. verhindern. Vielleicht liegt es an der höheren Konzentration von DMSO als Kryoprotektor in den Gruppen G1 und G3, der eine Proliferationsneigung von glatten Muskelzellen nach Endothelschäden senkt.

Neben der Häufigkeit von Intimahyperplasien in den Transplantaten wurden in dieser Arbeit auch die Flächen der Intimahyperplasie im μm^2 untersucht. Zusätzlich wurde deren Ausdehnungen ins Verhältnis zur gesamten Querschnittsfläche der Gefäßwände - als Ratio Intima/Media - gesetzt. Dies wurde untersucht, um den unterschiedlich großen Gefäßen der einzelnen Gefäßspender Rechnung zu tragen.

In beiden Untersuchungen fiel das Ergebnis sehr ähnlich aus. In der Gruppe G3 fanden sich die flächenmäßig kleinsten Intimahyperplasien sowie jeweils die kleinste Ratio und damit das beste Ergebnis. Nach 4 Wochen Beobachtungszeit bringt der alleinige Einsatz des Kryoprotektors DMSO in der Gruppe G1 das schlechteste Ergebnis im Mittel. Der Mittelwert wird jedoch durch eine sehr ausgeprägte Intimahyperplasie eines einzelnen Gefäßes in dieser Gruppe stark nach oben verschoben. Nach 24 Wochen wird das schlechteste Ergebnis in der Gruppe G2 mit der Kombination von 10% DMSO und 2% CHSO beobachtet.

Auch hier verschiebt sich der Mittelwert durch den Wert eines einzelnen Gefäßes deutlich nach oben. Warum es in den beiden Beobachtungszeiträumen zu Verschiebungen der Ergebnisse kommt, bleibt unklar und passt nicht logisch zu den Ergebnissen bei der Häufigkeitsverteilung von Intimahyperplasien. Hiernach hätte man erwarten können, dass es in den Gruppen mit häufigem Auftreten von Intimahyperplasien es auch zu ausgedehnteren Intimahyperplasien kommt. Dies ist aber nicht der Fall.

Insgesamt zeigt sich jedoch ein deutlicher Vorteil für die Kombination eines intrazellulären und extrazellulären Kryoprotektors.

Bisher wurden erst in wenigen Studien über die Kombination der beiden Kryoprotektoren berichtet, aber auch in diesen Studien ergab sich ein Vorteil für DMSO + CHSO gegenüber dem alleinigen Einsatz von DMSO (Wu et al. 2007; Huang Ting et al. 1998).

Lehr konnte bei einer Kombination von 2% CHSO und DMSO bis 4% ebenfalls einen guten Erhalt von Endothelzellen bei der Kryopräservierung von Hornhäuten zeigen. Bei einer Zunahme von DMSO über 4% zeigte sich bei deren Untersuchung jedoch ein signifikant schlechterer Erhalt des Endothels. Dies ist vielleicht durch die insgesamt deutlich dünneren Gewebsschichten bedingt (Lehr et al. 1992).

5.4. Veränderungen der Elastica-Fasern der Tunica media

Kryopräservierung von Gewebe führt nicht nur zur Alteration von vitalen Zellen, sondern auch von extrazellulärer Matrix, die auch für die einwandfreie Funktion des Gewebes benötigt wird.

Die glatten Muskelzellen der Media sind mit den elastischen Fasern der Media verbunden und bilden das sogenannte „elastisch-muskulöse System“ der Gefäßwand, deren Spannung sie durch ihre Kontraktion regulieren können (Welsch 1994).

Die Schlängelung der elastischen Fasern der Gefäßwand gibt also einen indirekten Hinweis auf die Funktion der glatten Muskelzellen. Findet sich eine deutliche Schlängelung der elastischen Fasern, so kann man davon ausgehen, dass die glatten Muskelzellen sich kontrahieren können und weitestgehend intakt sind. Während eine Streckung der elastischen Fasern auf eine schlechte Funktion hindeutet.

Um die Funktion der glatten Muskelzellen abschätzen zu können, erfolgte in dieser Arbeit die Beurteilung der elastischen Fasern anhand ihrer Schlängelung semiquantitativ in vier Schritten von „sehr gut“ bis „schlecht“.

Die am besten erhaltene Schlängelung der elastischen Fasern zeigten die Kontrollgruppen mit fast durchweg sehr gutem Ergebnis. In den Versuchsgruppen folgte dahinter die Gruppe G1 mit nur 15% DMSO als Kryoprotektor. Der Erhalt der Schlängelung der elastischen Fasern in den Kontrollgruppen und der Gruppe G1 nach 4 Wochen zeigte keinen Unterschied zum Beobachtungszeitraum über 24 Wochen. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten von Schmidt sowie von Schoeffter und Müller-Schweinitzer (Schmidt 1998; Schoeffter und Müller-Schweinitzer 1990).

Die Gruppen G2 und G3 zeigten eine deutliche Beeinträchtigung der Funktion der Media. Die elastischen Fasern waren weniger geschlängelt und zeigten häufiger Abbrüche. Über den längeren Beobachtungszeitraum nahm dazu die Schlängelung weiter ab.

In der Literatur werden unterschiedliche Angaben zum Erhalt der elastischen Fasern und der mechanischen Belastbarkeit von kryopräservierten Gefäßen gemacht. So hat Gournier et al nach Kryopräservierung von thorakalen Aorten in 15% DMSO ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu frischen Gefäßen finden können (Gournier et al. 1993).

Andere Arbeiten beschreiben eine Ausdünnung der Media mit Zellverlusten der glatten Muskulatur und Brüchen an den elastischen Fasern und damit einen Abfall der mechanischen Belastbarkeit der Gefäße. Die Funktion der glatten Muskulatur war nach Kryopräservierung meist deutlich herabgesetzt (Thakrar et al. 2006; Wang et al. 2005; Pascual et al. 2005; Rendal et al. 2004).

Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen kein DMSO sondern Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) oder 1,2- Propandiol (PROH) als Kryoprotektoren eingesetzt.

Weitere Arbeiten beschreiben zwar ebenfalls einen Abfall der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand nach Kryopräservierung, allerdings wurde dabei kein Abfall der mechanischen Belastbarkeit der Gefäße beobachtet (Langerak et al. 2001).

Der bessere Erhalt der mechanischen Belastbarkeit der Gefäße in der Gruppe G1 nach Kryoprotektion nur mit DMSO, spiegelt sich auch in der Entwicklung von Aneurysmen im Anastomosenbereich wider. In der Gruppe G1 fand sich in der Auswertung über beide Beobachtungszeiträume kein Aneurysma in den Nahtbereichen.

Die mechanische Belastbarkeit der Gefäße hängt damit nicht nur von der Funktion der glatten Muskulatur in der Media ab, sondern auch von den elastischen und kollagenen Fasern.

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten ist bei der Kryopräservierung von Gefäßen zum bestmöglichen Erhalt der Tunica media der Einsatz von DMSO zu empfehlen.

Der Erhalt dieser Fasern ist wichtig für den klinischen Einsatz von kryokonservierten Gefäßen. Insbesondere bei Bypassen, bei denen häufig Seit-zu-End Anastomosen zum Einsatz kommen, entstehen im Nahtlager deutlich erhöhte Spannungen durch nicht linearen Blutfluss. Hier gilt es ein Ausreißen der Nähte zu verhindern, um Pseudoaneurysmen oder komplette Rupturen zu vermeiden (Ballyk et al. 1997).

Die Kombination von DMSO mit CHSO zeigt bei der Auswertung nicht so gute Ergebnisse bezüglich des Erhaltes der elastischen Fasern in der Tunica media. Diese Entwicklung hatte sich in den Ergebnissen in der Arbeit von Schmidt schon angedeutet. Im in-vivo Modell kommt es insbesondere über den längeren Beobachtungszeitraum zu einer geringeren Schlängelung der elastischen Fasern bei der Verwendung von CHSO neben DMSO. Dies und auftretende Nahtaneurysmen in den Gruppen G2 und G3 lassen auf einen schlechteren Erhalt der elastischen Fasern und Funktion der glatten Muskulatur schließen.

6. Zusammenfassung

Der Einsatz von Gefäßprothesen steigt bei Patienten mit zunehmenden Gefäßerkrankungen und fehlenden autologen Gefäßen immer weiter an. Der Einsatz allogener Gefäße von Spendern hat zum Ziel eine längere Durchgängigkeit und eine variablere Einsatzfähigkeit, als diese alloplastischen Gefäßprothesen zurzeit haben, zu erreichen. Allogene Gefäße müssen im Allgemeinen konserviert werden zur Lagerung. Dies ist jedoch nur durch Kühlung der Gefäße weit unter dem Gefrierpunkt zeitlich unbegrenzt möglich. Dazu bedarf es bei der Kryokonservierung Medien, die die Strukturen und Vitalität der Gefäße trotz des Einfrier- und Auftauprozesses erhalten. Die bisher verfügbaren Kryoprotektoren können dies nur zum Teil, sodass klinische Ergebnisse mit implantierten allogenen Gefäßen nach Kryopräservierung keine wesentlich besseren Ergebnisse zeigten, als alloplastische Gefäßprothesen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine verbesserte Gefäßfunktion von kryopräservierten Aorten im in-vivo Modell unter Einsatz von unterschiedlichen Kryoprotektoren zu erreichen.

Dazu wurden Rattengefäße in 15% DMSO sowie in Kombinationen aus 10% DMSO mit 2% CHSO und aus 15% DMSO mit 2% CHSO kryopräserviert. Nach Implantation der Gefäße erfolgte nach festgelegten Beobachtungszeiten die Explantation und histologische Nachuntersuchung mittels Masson-Goldner Färbung.

Im Vergleich der kryokonservierten Gefäße mit der Kontrollgruppe zeigten diese, bis auf die Anzahl von ausgebildeten Pseudoaneurysmata, insgesamt schlechtere Ergebnisse. Die besten Ergebnisse beim Erhalt des Endothels erreichte die Kombination von 10% DMSO mit 2% CHSO. Am wenigsten Aneurysmata bildeten sich unter dem alleinigen Einsatz von 15% DMSO.

Unter der Verwendung von 15% DMSO und 2 % CHSO kam es am seltensten zur Ausbildung einer Intimahyperplasie. In Bezug auf die absolute Ausdehnung der Intimahyperplasie und in Relation zum Gefäßwandquerschnitt erzielte diese Kombination der Kryoprotektoren ebenfalls die besten Ergebnisse.

Der beste Erhalt der elastischen Fasern zeigte sich wiederum unter dem alleinigen Einsatz von 15% DMSO.

Werden alle Ergebnisse der Untersuchungen zusammen betrachtet, so ergibt sich der gleichmäßigste Erhalt aller unterschiedlichen Gefäßwandschichten mit der Kombination von Kryoprotektoren aus 15% DMSO und 2% CHSO.

Somit zeigt sich in diesem in-vivo Modell im Vergleich zum in-vitro Modell von Schmidt ein Vorteil zugunsten der Kombination von Kryoprotektoren aus 15% DMSO und 2% CHSO gegenüber 10% DMSO und 2% CHSO und 15% DMSO als alleinigen Kryoprotektor.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abbott MW, Green RM, Matsumoto T, Wheeler JR, Miller N, Veith FJ, Suggs WD, Hollier L, Money S, Garrett HE**
Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: Results of a multicenter randomized prospective trial.
J Vasc Surg, Vol 25, Issue 1, January 1997, Pages 19-28.
2. **Abe S, Fujita T, Takami Y**
Disappearance of Langerhans cells and melanocytes after cryopreservation of skin.
British Journal of Plastic Surgery, Vol 48, Issue 6, Pages 405-409
3. **Abebe W, Cavallari N, Agrawal DK, Rowley J, Thorpe PE, Hunter WJ**
Edwards JD, Functional and Morphological Assessment of Rat Aorta Stored in University of Wisconsin and Eurocollins Solutions.
Transplantation 1993, Vol. 56(4):808-816.
4. **Almassi GH, Farahbakhsh B, Wooldridge T, Rusch NJ, Olinger GN**
Endothelium and vascular smooth muscle function in internal mammary artery after cryopreservation.
J Surg Res. 1996 Feb 1;60(2):355-60.
5. **Angell WW, Angell JD, Oury JH, Lamberti JJ, Grehl TM**
Long-term follow-up of viable frozen aortic homografts. A viable homograft valve bank.
J Thorac Cardiovasc Surg 1987, Vol 93, 815-822.
6. **Ashwood-Smith MJ, Farrant J**
Low temperature preservation in medicine and biologie.
In: Turnbridge Wells, Kent: Pittman medical 1980;12-22.
7. **Ballyk PD, Walsh C, Butany J, Ojha M**
Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses.
Journal of Biomechanics 1997 Dec, Vol 31, Issue 3, Pages 229-237.
8. **Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC**
Expanded application of in situ replacement for prosthetic graft infection.
J Vasc Surg, Vol 34, Issue 3, September 2001, Pages 411-420.

9. **Bank HL and Brockbank KGM**
Basic principles of cryobiology.
J Cardiac Surg. 2(1987), pp. 137–143.
10. **Barner HB , Standeven JW, Reese J**
Twelve-year experience with internal mammary artery for coronary artery bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1985, Vol 90, 668-675.
11. **Baron H, Plenz G, Deng MC**
Mechanismen der Transplantatvaskulopathie.
Dtsch med Wochenschr 2004; 129: 2193-2197.
12. **Bassiouny HS, White S, Glagov S, Choi E, Giddens DP, Zarins CK**
Anastomotic intimal hyperplasia: mechanical injury or flow induced.
J Vasc Surg. 1992 Apr;15(4):708-16.
13. **Böhnke M, Hagenah M, Draeger J**
Kryokonservierung von Schweinehornhäuten mit Chondroitinsulfat.
Klin Monatsbl Augenheilkd 1987; 191(10): 283-286.
14. **Boren CH, Roon AJ, Moore WS**
Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation.
Surgery 1978; 38(4):382-391.
15. **Boylan MJ, Lytle BW, Loop FD, Taylor PC, Borsh JA, Goormastic M, Cosgrove DM**
Surgical treatment of isolated left anterior descending coronary stenosis: Comparison of left internal mammary artery and venous autograft at 18 to 20 years of follow-up.
J Thorac Cardiovasc Surg 1994;107:657-662.
16. **Brockbank KG**
Effects of cryopreservation upon vein function in vivo
Cryobiology 1994 Feb;31(1):71-81.
17. **Buján J**
Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. Cryobiology 2001 Jun;42(4):256-65.
18. **Buján J, Pascual G, García-Honduvilla N, Gimeno M J , Jurado F, Carrera-San Martín A and Bellón JM**
Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2000 Jul; 20(1):13-20.

- 19. Castier Y, Lesèche G, Palombi T, Petit MD, Cerceau O**
Early experience with cryopreserved arterial allografts in below-knee revascularization for limb salvage.
Am J Surg 1999 Mar, Vol 177, Issue 3, Pages 197-202.
- 20. Chen C, Li J, Mattar SG, Pierce GF, Aukerman L, Hanson SR, Lumsden AB**
Boundary layer infusion of basic fibroblast growth factor accelerates intimal hyperplasia in endarterectomized canine artery.
J Surg Res. 1997 May; 69(2):300-6.
- 21. Dashwood MR, Anand R, Loesch A, Souza DS**
Hypothesis: a potential role for the vasa vasorum in the maintenance of vein graft patency.
Angiology 2004 Jul-Aug;55(4):385-95.
- 22. Dashwood MR, Savage K, Tsui JC, Dooley A, Shaw SG, Fernandez Alfonso MS, Bodin L, Souza DS**
Retaining perivascular tissue of human saphenous vein grafts protects against surgical and distension-induced damage and preserves endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide synthase activity.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2009 Aug;138(2):334-40.
- 23. Davidović LB, Lotina SI, Kostić DM, Cinara II, Cvetković SD, Stojanović PL, Velimirović LB, Marković DM, Pejkić SL, Pavlović G**
Dacron and polytetrafluoroethylene aorto-bifemoral grafts.
Srp Arh Celok Lek. 1997 Mar-Apr;125(3-4):75-83.
- 24. Davidovic L, Vasic D, Maksimovic R, Kostic D, Markovic D, Markovic M**
Aortobifemoral grafting: factors influencing long-term results.
Vascular 2004 May-Jun;12(3):171-8.
- 25. Delfino VDA, Gray DWR, Leow C, Shimizu S, Ferguson DJP, Morris PJ**
A Comparison of Four Solutions for Cold Storage of Pancreatic Islets1.
Transplantation 1993 Dec, 56(6): 1325-1330.

26. **Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P**
Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: A 9-year experience.
Surgery 1999 Nov, Vol 126, Issue 5, Pages 847-855.
27. **Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information(DIMDI)**
im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit,
www.GBE-Bund.de 2009 (Stand 9/2009).
28. **Dhesi JK, Thompson MM, James RFL, Bell PRF, Budd JS**
Cryopreserved saphenous vein allogeneic homografts.
J Vasc Surg 1993 Feb, Vol 17, Issue 2, Pages 451-452.
29. **Eskew TD, Ollerenshaw JD, Philpott JM, Dennis K, Dawson P, Sun YS, Chitwood WR JR., Lust RM**
Successful Small Diameter Arterial Grafting Using Cryopreserved Allograft Arteries.
ASAIO Journal 1997; 43:M522-M526.
30. **Fujitani RM, Bassiouny HS, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK**
Cryopreserved saphenous vein allogeneic homografts: An alternative conduit in lower extremity arterial reconstruction in infected fields.
J Vasc Surg 1992 Mar, Vol 15, Issue 3, Pages 519-526.
31. **Gaylis H, Deware G**
Anastomotic aneurysms: facts and fancy.
Ann Surg 1990; 22:317-41.
32. **Gournier JP, Adham M, Favre JP, Raba M, Bancel B, Lepetit JC, Barral X**
Cryopreserved arterial homografts: Preliminary study.
Ann Vasc Surg 1993 Nov, Volume 7, Number 6.
33. **Gu S, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, Chen JH**
Abdominal aorta transplantation after programmed cryopreservation.
World J Gastroenterol 2004; 10(4): 555-559
34. **Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E and Karsch KR**
Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty.
Circulation Research 1990, Vol 67, 651-659.

- 35. Hartmann AR, Vlay SC, Dervan JP**
Emergency coronary revascularisation using polytetrafluoroethylene conduits in a patient in cardiogenic shock.
Clin cardiol. 1991, 14:75-8.
- 36. Heyligers JMM, Arts CHP, Verhagen HJM, de Groot PG, Moll FL**
Improving Small-Diameter Vascular Grafts: From the Application of an Endothelial Cell Lining to the Construction of a Tissue-Engineered Blood Vessel.
Ann Vasc Surg, Vol 19, Issue 3, May 2005, Pages 448-456.
- 37. Huang Ting, Chen Jia qi, Zhen Hu ling**
Effects of chondroitin sulfate on corneal endothelial cells in corneal cryopreservation.
Chinese Journal of Practical Ophthalmology, 1998-02.
- 38. Jackson MR, Belott TP, Dickason T, Kaiser WJ**
The consequences of a failed femoropopliteal bypass grafting: Comparison of saphenous vein and PTFE grafts.
J Vasc Surg 2000, Vol 32, Issue 3, Pages 498-505.
- 39. Jensen LP, Lepäntalo M, Fossdal JE, Røder OC, Jensen BS, Madsen MS, Grenager O**
Dacron or PTFE for Above-knee Femoropopliteal Bypass. A Multicenter Randomised Study.
European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2007 Jul, Vol 34, Issue 1, Pages 44-49.
- 40. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, Van Bockel JH**
Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature.
European Journal of Vascular & Endovascular Surgery 2004, Vol 27, Issue 4, Pages 357-362.
- 41. Klinkert P, Schepers A, Burger DH, van Bockel JH, Breslau PJ**
Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: Five-year results of a randomized controlled trial.
J Vasc Surg 2003, Volume 37, Issue 1, Pages 149 – 155.
- 42. Klotz S, Scheld HH**
Modern Therapeutic Strategies for Coronary Artery Bypass Grafting (CABG).
Dtsch Arztebl 2007; 104(48):A 3334–9.

- 43. Knosalla C**
Experimentelle und klinische Untersuchungen über den Gebrauch von Allograft-Material zur in situ-Behandlung von Infektionen im Bereich der Aorta.
Med. Habilitation, Humboldt Universität zu Berlin 2001, Germany.
- 44. Koglin J**
Pathogenetic mechanisms of cardiac allograft vasculopathy--impact of nitric oxide,
Z Kardiol. 2000;89 Suppl 9:IX/24-7
- 45. Lang W, Schmidt O, Radespiel-Tröger M, Schweiger H**
Der supragenuale PTFE-Bypass.
Gefäßchirurgie 2001; 6:34-40.
- 46. Lang W, Horch RE**
Der pedale Bypass beim diabetischen Fußsyndrom und zum Extremitätenerhalt bei Problemwunden.
2005 CHAZ – 6.Jahrgang, 5.Heft, S.229-233.
- 47. Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, van Baal MC, Spaan JAE**
Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts.
Transplant International 2001, Vol 14, Number 4: 248-255.
- 48. Lehalle B, Geschier C, Fiévé G, Stoltz JF**
Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts.
J Vasc Surg 1997 Apr, Vol 25, Issue 4, Pages 751-752.
- 49. Lehr R, Hagenah M, Böhnke M**
Freeze preservation of swine corneas with combinations of intra- and extracellular cryoprotective agents.
Ophthalmologie 1992 Dec;89(6):519-23.
- 50. Lesèche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O**
Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. J Vasc Surg 2001 Oct, Vol 34, Issue 4, Pages 616-622.
- 51. Mazur P, Leibo SP, Chu EH**
A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.
Exp Cell Res. 1972;71(2):345-55.

- 52. Miyazaki K, Nishibe T, Sata F, Miyazaki YI, Kudo FA, Flores J, Yasuda K**
Prosthetic grafts for above-knee femoropopliteal bypass. A multicenter retrospective study of 564 grafts.
Int Angiol. 2002 Jun; 21(2):145-51.
- 53. Moore WS, Hall AD**
Late Suture Failure in the Pathogenesis of Anastomotic False Aneurysms.
Ann Surg. 1970 Dec; 172(6): 1064–1068.
- 54. Motomura N, Imakita M, Yutani C, Takamoto S, Kitoh Y, Tsuji T, Kawashima Y, Wada Y, Oka T**
Histologic modification by cryopreservation in rat aortic allografts.
Ann Thorac Surg. 1995 Aug;60(2 Suppl):S168-71.
- 55. Motwani JG, Topol EJ**
Aortocoronary Saphenous Vein Graft Disease.
Circulation 1998;97:916-931.
- 56. Müller-Schweinitzer E**
Cryopreserved Isolated Tissues in Pharmacological Research.
ALTEX 1991;8(2):40-51.
- 57. Müller-Schweinitzer E**
Impact of freezing/thawing procedures on the post-thaw viability of cryopreserved human saphenous vein conduits.
Cryobiology 2007 Feb;54(1):99-105.
- 58. Muehrcke DD, Ratnani MS, Loop FD(1998)**
Arterial versus venous Bypass Graft Surgery.
In: Saphenous vein bypass graft disease , Bates ER, Holmes DR(1998); Informa Healthcare, 11-20.
- 59. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, McGiffin DC**
A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies.
J Thorac Cardiovasc Surg 1987 Dec, Vol 94, 812-823.
- 60. Parsons RE, Suggs WD, Lee JJ, Sanchez LA, Lyon RT, Veith FJ**
Percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of limb threatening ischemia: Do the results justify an attempt before bypass grafting?
J Vasc Surg, Vol 28, Issue 6, December 1998, Pages 1066-1071.

61. **Pascual G, Martínez S, Rodríguez M, Serrano N, Bellón JM, Buján J**
Patency and structural changes in cryopreserved arterial grafts used as vessel substitutes in the rat.
J Surg Res. 2005 Apr;124(2):297-304.
62. **Pascual G, Rodríguez M, Corrales C, Turégano F, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J**
New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes.
Cryobiology February 2004, Vol 48, Issue 1, Pages 62-71.
63. **Pasquinelli G, Foroni L, Buzzi M, Tazzari PL, Vaselli C, Mirelli M, Gargiulo M, Conte R, Stella A**
Smooth muscle cell injury after cryopreservation of human thoracic aortas.
Cryobiology 2006 Apr, Vol 52, Issue 2, Pages 309-316.
64. **Pegg DE**
Principles of tissue preservation.
In: Progress in Transplantation. Morris PJ, Tilney NL; pp 69-105,
New York 1985.
65. **Pegg DE**
Fractures in cryopreserved elastic arteries.
Cryobiology 1997 Mar;34(2):183-92.
66. **Pegg DE**
Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers.
Cryobiology 2002 Feb;(44)1: 46-53.
67. **Pözl G, Frick M**
Transplantvaskulopathie – Pathophysiologie, Diagnose und Therapie.
Austrian Journal of Cardiology 2009; 16 (3-4): 80-84
68. **Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM**
Allograft vasculopathy versus atherosclerosis.
Circ Res. 2006 Oct 13;99(8):801-15
69. **Randone B, Cucina A, Graziano P, Corvino V, Cavalarro G, Palmieri I, Cavalarro A, Sterpetti AV**
Suppression of smooth muscle cell proliferation after experimental PTFE arterial grafting: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) antibody.
Vasc Endovasc Surg 1998; 16: 401-407.

- 70. Rendal Vázquez ME , Rodríguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernández Mallo RO, Sánchez Ibáñez J, Segura Iglesias R, Matheu Capó G, Filgueira Fernández P, Pérttega Díaz S, Bermúdez González T, Andiñ NÚñez C**
Functional assessment of cryopreserved pig aortas for pharmaceutical research.
Cell Tissue Bank. 2004;5(2):111-8.
- 71. Rendal E, Martínez Santos MV, Rodriguez M, Sánchez J, Segura R, Matheu G, Filgueira P, Pérttega S and Andiñ C**
Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment.
Transplant Proc. 2004 Dec;36(10):3283-7.
- 72. Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G**
Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate, Osteoarthritis and Cartilage.
Osteoarthritis and cartilage 1998 May, Vol 6, Supp 1, Pages 14-21.
- 73. Rückert RI**
Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Optimierung der Hämodynamik in terminolateralen Prothesenbypass-Anastomosen.
Med. Habilitation, Humboldt Universität zu Berlin 2001, Germany.
- 74. Sabik JF 3rd, Lytle BW, Blackstone EH, Houghtaling PL, Cosgrove DM**
Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system.
Ann Thorac Surg. 2005 Feb;79(2):544-51; discussion 544-51.
- 75. Sapsford RN, Oakley GD, Talbot S**
Early and late patency of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts in aorta-coronary bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1981, 81:860-864.
- 76. Schmidt C**
Kryopreservation von Rattenarterien unter Verwendung von DMSO und Chondroitinsulfat.
Medizinische Dissertation, Universität Hamburg 1998, Germany.
- 77. Schoeffter P, Müller-Schweinitzer E**
The preservation of functional activity of smooth muscle and endothelium in pig coronary arteries after storage at -190 degrees C.
J Pharm Pharmacol. 1990 Sep;42(9):646-51.

- 78. Showalter D, Durham S, Sheppeck R, Berceli S, Greisler H, Brockbank K, Makaroun M, Webster M, Steed D, Siewers R**
Cryopreserved venous homografts as vascular conduits in canine carotid arteries.
Surgery 1989 Oct;106(4):652-8.
- 79. Solanes N, Rigol M, Castellà M, Khabiri E, Ramírez J, Segalés J, Roqué M, Agustí E, Pérez-Villa F, Roig E, Pomar JL, Sanz G, Heras M**
Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy.
Transplant Proc. 2004; 36(10):3288-94
- 80. Song YC, Pegg DE, Hunt CJ**
Cryopreservation of the Common Carotid Artery of the Rabbit: Optimization of Dimethyl Sulfoxide Concentration and Cooling Rate. Cryobiology 1995 Oct;32(5):405-25.
- 81. Souza DS, Christofferson RH, Bomfim V, Filbey D**
"No-touch" technique using saphenous vein harvested with its surrounding tissue for coronary artery bypass grafting maintains an intact endothelium.
Scand Cardiovasc J. 1999;33(6):323-9.
- 82. Stanke F, Riebel D, Carmine S, Cracowski JL, Caron F, Magne JL, Egelhoffer H, Bessard G, Devillier P**
Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation.
J Vasc Surg. 1998 Aug;28(2):273-83.
- 83. Stephen M, Sheil AGR, Wong J**
Allograft Vein Arterial Bypass.
Arch Surg. 1978;113(5):591-593.
- 84. Sterpetti AV, Cucina A, Lepidi S, Randone B, Stipa F, Aromatario C Travi D, D'Angelo SL, Cavallaro A, Stipa S**
Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblastic growth factor production.
J Vasc Surg 1996; 23: 568-575
- 85. Taylor MJ, Bank HL, Benton MJ**
Selective killing of leucocytes by freezing: potential for reducing the immunogenicity of pancreatic islets.
Diabetes Res. 1987; 5:99-103.

- 86. Thakrar RR, Patel VP, Hamilton G, Fuller BJ, Seifalian AM**
Vitreous cryopreservation maintains the viscoelastic property of human vascular grafts.
The FASEB Journal 2006;20:874-881.
- 87. Tilanus HW, Obertop H, Van Urk H**
Saphenous vein or PTFE for femoropopliteal bypass. A prospective randomized trial.
Ann Surg. 1985 Dec; 202(6): 780–782.
- 88. Van den Akker PJ, Brand R**
False aneurysms after prosthetic reconstructions for aortoiliac obstructive disease.
Ann Surg 1989; 210(3):658-666.
- 89. Van der Zaag ES, Legemate D, Prins M, Reekers J, Jacobs M**
Angioplasty or Bypass for Superficial Femoral Artery Disease? A Randomised Controlled Trial.
European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2004 Aug, Vol 28, Issue 2, Pages 132-137.
- 90. Vannereau H, Novakovithe G, Carin M**
Cryobiology of complex tissues.
Contracept Fertile Sex 1998, 26 (7-8): 573-7.
- 91. Vischjäger M, van Gulik TM, van Marle J**
Function of cryopreserved arterial allografts under immunosuppressive protection with cyclosporine A.
J Vasc Surg 1996; 24(5): 876-882.
- 92. Vischjager M, Van Gulik TM, Van Marle J, Pfaffendorf M, Jacobs MJ**
Function of cryopreserved arterial allografts under immunosuppressive protection with cyclosporine A.
J Vasc Surg 1996 Nov, Vol 24, Issue 5, Pages 876-882.
- 93. Vogt PR, von Segesser LK, Goffin Y, Pasic M, Turina MI**
Cryopreserved arterial homografts for in situ reconstruction of mycotic aneurysms and prosthetic graft infection.
European Journal of Cardio Thoracic Surgery 1995; Vol 9, Issue 9, Pages 502-506.
- 94. Vogt PR, Zünd G, Lachat M, Turina MI**
Regarding “Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts”.
J Vasc Surg 1998 Jan; Vol 27, Issue 1, Page 189.

- 95. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R**
Fresh Venous Allografts In Peripheral Arterial Reconstruction In Dogs – Effects Of Histocompatibility And Of Short-term Immunosuppression With Cyclosporine A And Mycophenolate Mofetil.
J Thorac Cardiovasc Surg 1995, 110:1732-1744
- 96. Wang P, Shu Z, He L, Wang Y, Cui X, Yu J, Lu J, Gao D**
The Viability, Structure, and Mechanical Properties of Cryopreserved Rabbit Carotid Artery.
Cell Preservation Technology 2005, 3(2): 85-95.
- 97. Welsch U**
Histologie – Farbatlas der mikroskopischen Anatomie
(Sobotta; Hammersen)
IV. Auflage, S. 127, München – Wien – Baltimore,
Urban&Schwarzenberg 1994
- 98. Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP**
Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury.
Circulation 1987; 75: 636-642.
- 99. Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, Ganz R, Leunig M**
Cryopreservation of Osteochondral Allografts: Dimethyl Sulfoxide Promotes Angiogenesis and Immune Tolerance in Mice.
The Journal of Bone and Joint Surgery (American) 2002, 84:1420-1429.
- 100. Wu A, Zhou H, Zhu H**
Protective effect of chondroitin sulfate on homograft aortic valve cryopreserved in liquid nitrogen.
Journal of Harbin Medical University, 2007-05.
- 101. Wusteman MC, Pegg DE**
Differences in the requirements for cryopreservation of porcine aortic smooth muscle and endothelial cells.
Tissue Eng. 2001 Oct; 7(5):507-18.
- 102. Yu HB, Shen GF, Wie FC**
Effect of Cryopreservation on the Immunogenicity of Osteoblasts.
Transplantation Proceedings 2007 Dec, Vol 39, Issue 10,
Pages 3030-3031

8. Abkürzungen

bFGF	basic fibroblastic growth factor
BSA	bovine serum albumin = fetales Kälberserum
CHSO	Chondroitinsulfat
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelial cells
ECM	extracellular Matrix
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOPC-21	Monoklonaler IgG1 kappa Mausantikörper
NO	Stickstoffmonoxid
PAK	Primär Antikörper
PDGF	platelet derived growth factor
PROH	1,2- Propandiol
PTA	Percutane Transluminale Angioplastie
PTFE	Polytetraflourethylen
RECA	rat endothelial cell antibody
SMC	smooth muscle cells
TBS	Tris Buffered Saline
TEA	Thrombendarteriektomie
USSC	United States Surgical Corporation

9. Geräte und Materialien

- Bovine Serum Albumin (BSA), Cat.-No: 85041C, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Germany
- Chondroitin Sulfat C, Cat.-No: 4384, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Germany
- Cryoson BV 25 Freezer; Cryoson Deutschland GmbH,
- Dako EnVision +R System-HRP, Dako Cytomation REF K 4007; LOT 00003677, Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg
- Dako Target Retrieval; 10x Conc., Dako Cytomation REF S 1699; LOT 00003166, Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg
- Eukitt 100ml, Cat.-No: 03989, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Germany
- Feather Microtome Blades, S35, FEATHER BLDG., Osaka 530-0003, Japan
- Gefriergefäß NUNC Cryotubes 1,8ml, Cat.-No: 340711, Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG)
- Image J 1.40g, Java-Programm, Publicdomain, rsb.info.nih.gov/ij
- Mayers Haematoxylin Solution, Cat.-No: MHS 16, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Germany
- Medium 199 liquid; Produkt-Nr. 11043023; Gibco Products, Invitrogen GmbH, Germany
- Methoxyflourane, CAS No.: 36886-76-7, Chemos GmbH Germany
- Mikrotom, Typ HM 335, Microm GmbH, Germany
- MOPC 21, purified immunoglobulin IgG1, Cat.-No: M 9269; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany
- Nahtmaterial Monosof 3/0 und 8/0, Cat.-No: N-2543, Polysorb 3/0, Cat.-No: GL-182, Fa. USSC Sutures, USA

- Objektträger, Histobond, Cat.-No.: 08 100 00, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany
- RECA-1 Monoclonal antibody, Mouse Anti-Rat; Isotyp: IgG 18 mouse, unconjugated, Clone his52, Cat.-No: MCA 970 R, AbD Serotec, Germany
- Roti-Histol, Cat.-No: 6640.1, Fa. Carl Roth GmbH + Co KG; Germany
- TBS Dako Wash Buffer 10x, Dako Cytomation REF S 3006, Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg
- Trichrom Lösung: Chromotrop 2R 3,0g, Fast Green 1,5g, Phosphorstickacid 3,0g, Eisessig 1% 2,5ml, Ad 250ml Aqua dest., pH 3,4

10. Danksagung

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit der Untersuchungen im Forschungslabor der Abteilung für Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf möchte ich mich bei PD Dr. Dr. med. J.-M. Pollok herzlich bedankt.

Herrn Dr. med. Zsolt Kiraly möchte ich danken für die engagierte Betreuung, Ausdauer und Hilfsbereitschaft in allen Fragen dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Silke Brillhof, MTA des chirurgischen Forschungslabors, ohne deren unermüdliche Hilfe, Geduld in allen Fragen und Fachwissen in der Laborarbeit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Prof. Dr. vet. Alain de Bruin von der Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University (Dept. of Pathobiology), aussprechen, der mir wichtige Anstöße zum Aufbau der Arbeit sowie der statistischen und histologischen Auswertung gab.

Danken möchte ich auch meiner Frau Andrea und meinen Kindern Niclas und Yann für Ihre ausdauernde Geduld und Ihr Verständnis für die zeitaufwendige Arbeit.

11. 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.

Unterschrift: