

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Optimierung der kalten Lagerung von Blutgefäßen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Timo Wille

aus Geseke

2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. U. Rauen

2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K. Böngler

3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. A. Deußen

Tag der mündlichen Prüfung: 2. März 2010

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Wille, T., de Groot, H., Rauen, U. (2008): Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J. Vasc. Surg.* 47, 422-431.

Düppe, P.M., Talbierski, P.M., Hornig, F.S., Rauen, U., Korth, H.-G., Wille, T., Boese, R., Omlor, T., de Groot, H., Sustmann, R. (2009): Pyrene-based fluorescent nitric oxide cheletropic traps (FNOCTs) for the detection of nitric oxide (NO) in cell cultures and tissues. *Chemistry, in Revision*.

Abstracts:

Wille, T., de Groot, H., Rauen, U. (2006): Study of storage injury to the endothelium of porcine aortic segments. *Cryobiology* 53, 436.

Wille, T., Zatschler, B., de Groot, H., Deußen, A., Rauen, U. (2007): Untersuchungen zur Optimierung der kalten Lagerung von Gefäßen. *Transplantationsmedizin* 19, 92.

Wille, T., Garbe, S., Zatschler, B., de Groot, H., Matschke, K., Deußen, A., Rauen, U. (2008): Development of a new vascular preservation solution. *Cryobiology* 57, 331-332.

**Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen zur
Fachdiskussion gestellt (ohne Abstractband):**

12. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ in Xanten (Dez.
2006)

13. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ in Xanten (Dez.
2007)

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Organ- und Gewebekonservierung	1
1.2.	Mechanismen der Konservierungsschädigung von Organen.....	1
1.2.1.	Hypoxische Schädigung	2
1.2.2.	Kälteschädigung	4
1.2.3.	Schädigung durch Konservierungslösungen	6
1.3.	Organkonservierungslösungen	6
1.4.	Gefäßtransplantate und kalte Lagerung von Gefäßen.....	10
2.	Fragestellung.....	12
3.	Material und Methoden	13
3.1.	Chemikalien	13
3.2.	Behältnisse und sonstige Materialien	15
3.3.	Blutgefäße.....	16
3.4.	Zusammensetzung der Konservierungslösungen	17
3.5.	Versuche mit Aortensegmenten vom Schwein	17
3.6.	Bestimmung der Vitalität der Endothelzellen in Gefäßsegmenten ...	19
3.7.	Bestimmung funktioneller Parameter	22
3.7.1	Mitochondriales Membranpotential.....	22
3.7.2.	Bestimmung der endothelialen Stickstoffmonoxidfreisetzung (NO) mit Pyren-FNOCT	23
3.7.3.	Thrombozytenadhäsion	27
3.8.	Ergänzende Versuche mit isolierten Schweineaorten- endothelzellen	29
3.9.	Statistik	31
4.	Ergebnisteil.....	32
4.1.	Etablierung der Nachweisverfahren	32

4.1.1.	Vitalitätsuntersuchungen	32
4.1.2.	Mitochondriales Membranpotential.....	32
4.1.3.	Stickstoffmonoxidmessungen mit FNOCT	34
4.1.4.	Thrombozytenadhäsion	36
4.2.	Auftreten einer kälteinduzierten Schädigung an Endothelzellen von Schweineaortensegmenten	37
4.3.	Partiell eisenabhängige Kälteschädigung an Endothelzellen von Schweineaortensegmenten.....	38
4.4.	Unabhängigkeit des Eisenchelatorschutzeffektes von der eingesetzten Konservierungslösung im <i>in situ</i>-Endothel	38
4.5.	Optimierung der Basislösung	39
4.5.1.	Einfluss und Optimierung der Anionenzusammensetzung	40
4.5.2.	Optimierung des Kations	42
4.5.3.	Überprüfung von Puffersystem und Aminosäurekonzentrationen	43
4.6.	Optimierung des Eisenchelatorzusatzes	44
4.7.	Weitere Testung der Basislösung mit optimierter Chelorkonzentration	46
4.8.	Vergleich der besten Lösung mit den momentan klinisch eingesetzten Lösungen bezüglich Endothelzellvitalität im intakten Gefäß.....	47
4.9.	Mitochondriales Membranpotential.....	49
4.10.	Thrombozytenadhäsion.....	53
5.	Diskussion	55
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	67
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	80
9.	Danksagung.....	81
10.	Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1. Organ- und Gewebekonservierung

In der Transplantationsmedizin werden entnommene Organe routinemäßig bei Kälte (0 - 4°C) in Konservierungslösungen gelagert, um die Organe vor Schädigungen zu schützen. Die Konservierungslösungen haben dabei einen großen Einfluss auf die Qualität und spätere Funktion der gelagerten Organe, so dass einer verbesserten Organkonservierung bei einem Mangel an Organen eine wachsende Bedeutung zukommt. Einerseits können die Konservierungslösungen das Zeitfenster bis zur Transplantation verlängern, um den am besten geeigneten Empfänger zu finden, und andererseits kann durch die Möglichkeit der Transplantation nicht optimaler Spenderorgane (marginal organs) der Organspendepool vergrößert werden. In der operativen Medizin hat zudem der ehemals kleine Bereich der Gewebespende deutlich an Bedeutung zugenommen. Analog zur Transplantation kompletter Organe, werden dabei in bestimmten Situationen auch Gewebe, wie z.B. Blutgefäße, transplantiert. Die Lagerung von Gefäßen ist bisher wenig verbreitet, nimmt aber auf Grund des Bedarfs an freien Gefäßtransplantaten kontinuierlich zu, so dass 2007 den 145 in Deutschland transplantierten Gefäßen ein Bedarf von mehr als 500 Gefäßtransplantaten gegenüber stand (Jessel, S., 2008). Davon ausgehend, dass die Schädigungsmechanismen in Geweben ähnlich denen im Organ sind, und aus Mangel an Alternativen, werden für die Gewebekonservierung die Lagerungsbedingungen der Organkonservierung zum Großteil einfach übernommen, weswegen hier zu Beginn die Schädigungsmechanismen der Organkonservierung beschrieben werden.

1.2. Mechanismen der Konservierungsschädigung von Organen

Hypothermie wird in der Medizin und Biologie weitverbreitet in experimentellen und klinischen Anwendungen für die Lagerung von Zellen, Geweben und Organen eingesetzt, um metabolische Prozesse zu verlangsamen und schädigende Prozesse durch Sauerstoff- und Substratmangel zu verhindern. Dennoch kommt

es bei der kalten Lagerung von Organen in Konservierungslösungen trotz der Verringerung des Substrat- und Energiemangels (entsprechend der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) zu einer deutlichen Schädigung der gelagerten Zellen, Gewebe und Organe, der so genannten Konservierungsschädigung (Blankensteijn, J. D. et al., 1991; Clavien, P.-A. et al., 1992).

Die Konservierungsschädigung setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen (Abbildung 1). Unterschieden werden die ischämische (hauptsächlich hypoxische) Schädigung während der Lagerung mit anschließender Reperfusionsschädigung nach Anschluss an den Blutkreislauf des Empfängers (Jaeschke, 1991; Clavien, P.-A. et al., 1992; Lemasters, J. J. et al., 1993), die Kaltlagerung selbst mit nachfolgender Wiedererwärmung (Rauen, U. et al., 1999; Rauen, U. et al., 2000; Rauen, U. et al., 2002) und die von den eingesetzten Konservierungslösungen ausgehende Toxizität (Rauen, U. et al., 2007).

Die Konservierungsschädigung betrifft mit unterschiedlicher Schwere die verschiedenen Zelltypen eines Organs (Lemasters, J. J. et al., 1993). In Untersuchungen zur Optimierung der Lebertransplantation wurde festgestellt, dass die Hauptschädigung vor allem am mikrovaskulären sinusoidalen Gefäßendothel stattfindet (McKeown, C. M. et al., 1988; Caldwell-Kenkel, J. C. et al., 1989). Auch Ergebnisse in der experimentellen Herzkonservierung zeigen, dass die Koronarendothelzellen nach Kardioplegie empfindlicher sind als die Kardiomyozyten selbst und so ein Haupttarget der Konservierungsschädigung darstellen (Schroeder, C. et al., 2007).

1.2.1. Hypoxische Schädigung

Die hypoxische Schädigung ist die bekannteste Komponente der Konservierungsschädigung und beruht auf der Ischämie. Durch Sauerstoffmangel und die durch ATP-Mangel bedingte verminderte Aktivität ATP-abhängiger Ionenporter soll es zu einem Anstieg der cytosolischen Natriumkonzentration (Blankensteijn, J. D. et al., 1991) und Calciumkonzentration kommen, die zu Membranschädigungen und Zelltod führen (Hochachka, 1986; Blankensteijn, J. D. et al., 1991; Rosser, B. G. et al., 1995).

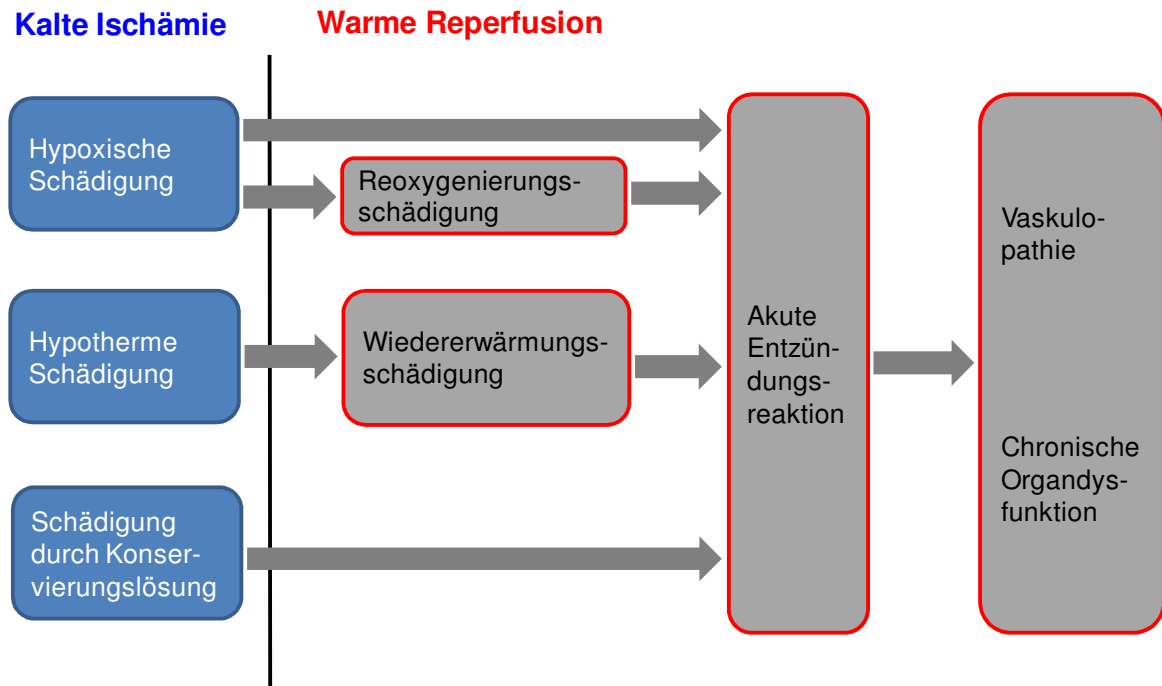


Abbildung 1. Schädigung bei kalter Ischämie und warmer Reperfusion.

Die Schädigung bei kalter Ischämie und warmer Reperfusion setzt sich aus den einzelnen Schädigungskomponenten Hypoxie/Reoxygenierung, Hypothermie/Wiedererwärmung und der von den Konservierungslösungen ausgehenden Schädigung zusammen. Während die anfängliche Schädigung ein fast ausschließlich intrazellulärer Prozess ist, kommt es später zu einer entzündlichen Reaktion. Modifiziert nach Rauen et al. (Rauen, U. et al., 2004).

Neuere Studien hingegen zeigen, dass bei isolierter Hypoxie der Hauptmechanismus der natriumabhängigen Schädigung über einen Na^+/K^+ -ATPase-unabhängigen Weg abläuft, bei dem unspezifische Membranporen eine wichtige Rolle spielen (Frank, A. et al., 2000). Durch den Einsatz von natriumfreien Medien kann konsequenterweise die hypoxische Schädigungskomponente verringert werden (Frank, A. et al., 2000; Fuckert, O. et al., 2000). Weiterhin verhindert die Aminosäure Glycin und das strukturverwandte Alanin die Ausbildung dieser unspezifischen Membranporen bei Hypoxie (Frank, A. et al., 2000).

Die Hypoxie spielt für die Schädigung von Koronarendothelzellen (Buderus, S. et al., 1989; Mertens, S. et al., 1990) und Leberendothelzellen (Rauen, U. et al., 1993; Rauen, U. et al., 1994) eher eine untergeordnete Rolle. Stattdessen steht bei diesen Zelltypen die Kälteschädigung im Vordergrund.

1.2.2. Kälteschädigung

Der schädigende Effekt der Hypothermie (0 - 4°C) wurde lange der kälteinduzierten Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase mit nachfolgender Erhöhung des intrazellulären Na⁺-Gehalts zugeschrieben. Dadurch sollte es zu einem passiven Influx von Chloridionen und Wasser mit konsekutiver Entwicklung eines zellulären Ödems kommen, das letztendlich zu einer Nekrose führt (Hochachka, 1986; Belzer, F. O. et al., 1988; Blankensteijn, J. D. et al., 1991; Clavien, P.-A. et al., 1992).

Neue Untersuchungen konnten hingegen zeigen, dass etliche kultivierte Zelltypen, inklusive Endothelzellen, keinen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration während (isolierter) Kaltinkubation zeigen (Gizewski, E. R. et al., 1997; Fuckert, O. et al., 2000). Stattdessen erleiden diese Zellen eine starke hypotherme Schädigung, die durch eine eisenabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt ist (Rauen, U. et al., 1997; Rauen, U. et al., 1997; Peters, S. M. et al., 1998; Rauen, U. et al., 1998; Salahudeen, A. K. et al., 2000). Eine unmittelbar nachfolgende Wiedererwärmungsphase auf physiologische Temperaturen, wie sie bei der Reperfusion von Organen auftritt, verstärkt dabei die Zellschädigung beträchtlich (Rauen, U. et al., 1997; Rauen, U. et al., 1998; Salahudeen, A. K. et al., 2001; Rauen, U. et al., 2002). Während der Wiedererwärmung zeigen die betroffenen Zellen eine Zell- und Kernschrumpfung, Chromatinkondensation, die Bildung von Membranausstülpungen (Blebs) und apoptotischen Körperchen als typische Merkmale. Einige Zelltypen zeigen zusätzlich eine Fragmentation der DNA (Rauen, U. et al., 1999; Kerkweg, U. et al., 2002). Die durch Hypothermie induzierten Zellschädigungen, die sich während der Wiedererwärmung demaskieren, entsprechen so den Kriterien des apoptotischen Zelltodes. Dieser Mechanismus wird dementsprechend kälteinduzierte Apoptose (Rauen, U. et al., 1999) genannt. Die eisenabhängige, kälteinduzierte Schädigung ist ein Phänomen, das bei vielen transplantationsrelevanten Zellen, wie Leberendothelzellen (Rauen, U. et al., 1999; Rauen, U. et al., 2000), Hepatozyten (Rauen, U. et al., 1999; Vairetti, M. et al., 2005) und Nierentubuluszellen (Bartels-Stringer, M. et al., 2003; Salahudeen, A. K. et al., 2003) nachgewiesen wurde. Besonders sensitiv für diesen Mechanismus sind jedoch Endothelzellen (Rauen, U. et al., 1999; Rauen, U. et al., 2000; Schroeder, C. et al., 2007). Die

Wiedererwärmungsphase ist dabei essentiell für die Manifestation der kompletten Schädigung und die Ausbildung der Apoptosezeichen, da nicht-wiedererwärmte Zellen eine geringere Schädigung und eine eher nekrotische Morphologie oder Mischformen der Zellschädigung zeigen (Rauen, U. et al., 1999; Salahudeen, A. K. et al., 2001). Die kälteinduzierte Schädigung ist dabei insbesondere vom chelatisierbaren, redoxaktiven Eisenpool abhängig (Rauen, U. et al., 2000; Huang, H. et al., 2002; Kerkweg, U. et al., 2002; Rauen, U. et al., 2002), der die niedrig reaktiven Sauerstoffspezies in hochreaktive Spezies wie das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) oder Eisensauerstoffverbindungen (Fe-O) überführt (Rauen, U. et al., 2000; Huang, H. et al., 2002; Kerkweg, U. et al., 2002; Rauen, U. et al., 2002; Rauen, U. et al., 2004). Messungen an isolierten Hepatozyten (Rauen, U. et al., 2000; Kerkweg, U. et al., 2002) und Nierentubuluszellen (Huang, H. et al., 2002) zeigten, dass der kälteinduzierte Anstieg von intrazellulärem chelatisierbarem Eisen kurz nach Beginn der Kaltinkubation erfolgt.

Ein kritisches Target der eisenabhängigen, kälteinduzierten Schädigung sind die Mitochondrien. Die hypotherme Lagerung von isolierten Hepatozyten, Nierentubuluszellen, Leberendothelzellen und Corneaendothelzellen führte zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der stark eisenabhängig war (Rauen, U. et al., 2003; Salahudeen, A. K. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2006). Dieser Mechanismus konnte dementsprechend durch die Zugabe eines Eisenchelators *in vitro* gehemmt werden. Andersherum ließ sich durch eine experimentell induzierte intrazelluläre Eisenüberladung von Hepatozyten die Zellschädigung nach Kaltlagerung imitieren (Rauen, U. et al., 2004). Im Gegensatz zum klassischen mitochondrialen Permeabilitätsübergang mit mitochondrialer Schwellung beim Hepatozyten zeigten isolierte Leber- und Corneaendothelzellen eine mitochondriale Ultrakondensation (Kerkweg, U. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2006), die ebenfalls im Zusammenhang mit apoptotischen Signalwegen steht und zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt (Jia, L. et al., 1997). Da Endothelzellen eine hohe glykolytische Aktivität besitzen, sind Mitochondrien für den Energiehaushalt der Zelle nicht essentiell (Mertens, S. et al., 1990; Davidson, S. M. et al., 2007). Aktuell wird diskutiert, welche Funktionen den Mitochondrien in Endothelzellen letztendlich zukommen; favorisiert werden dabei vor allem Signalfunktionen (Davidson, S. M. et al., 2007).

1.2.3. Schädigung durch Konservierungslösungen

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass von bestimmten Komponenten der Konservierungslösungen, die zur Protektion der Organe eingesetzt werden, selbst eine Zytotoxizität ausgeht. Vor allem die in diesen Lösungen zum Teil in hohen Konzentrationen eingesetzten Puffer Histidin und Phosphat, aber auch die Ionenkomposition, insbesondere die Abwesenheit von Calcium, tragen zur Toxizität der Konservierungslösungen bei (Rauen, U. et al., 2007; Rauen, U. et al., 2008). Bei der Toxizität durch Histidin konnte ein eisenabhängiger Schädigungsmechanismus nachgewiesen werden, der am ehesten auf der Bildung redox-aktiver Eisen-Histidin-Komplexe beruht (Rauen, U. et al., 2007). Die Toxizität des Phosphats steht im Zusammenhang mit der Calciumkonzentration (Rauen, U. et al., 2008). Detaillierte Informationen zu den Konservierungslösungen finden sich im nachfolgenden Kapitel.

1.3. Organkonservierungslösungen

Entsprechend dem klassischen Verständnis der hypoxischen Schädigung und einer Kälteschädigung auf Grund von Veränderungen der zellulären Ionenhomöostase wurden vor mehreren Dekaden Organkonservierungslösungen entwickelt, die den eingangs genannten Veränderungen der Ionenhomöostase entgegenwirken sollen (Na⁺-arm, zur Hemmung der Ödembildung, Tabelle 1). Bretschneider et al. entwickelten eine Lösung, die zunächst als kardioplegische Lösung eingesetzt wurde (Bretschneider, H. J., 1980). Die Hauptkomponenten dieser Lösung sind Histidin, Tryptophan und α -Ketoglutarat. Weiterhin enthält die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) impermeables Mannitol (30 mM) mit dem Ziel, die Entwicklung eines zellulären Ödems zu verhindern. Das Anwendungsspektrum der HTK-Lösung wurde 1988 auf die Kaltlagerung von Nieren ausgeweitet (Bretschneider, H. J. et al., 1988), und sie wird aktuell im Eurotransplant-Programm zur Leber- und Nierenkonservierung eingesetzt. Belzer et al. entwickelten die University of Wisconsin-Lösung (UW-Lösung) mit dem Ziel, die Entwicklung eines zellulären Ödems als Folge der verminderten Aktivität der

Na⁺/K⁺-ATPase und dem daraus resultierenden Natrium- und Wassereinstrom zu verhindern (Belzer, F. O. et al., 1988).

Tabelle 1. Zusammensetzung der klinisch eingesetzten Organkonservierungslösungen.

	HTK	UW	Perfadex	modif. HTK	Custodiol-N
Cl ⁻	50	-	142	0,04	30
H ₂ PO ₄ ⁻	-	25	0,8	-	-
SO ₄ ²⁻	-	5	0,8	-	-
α-Ketoglutarat	1	-	-	3	2
Aspartat	-	-	-	10	5
Lactobionat	-	100	-	11	-
Na ⁺	15	25	138	16	16
K ⁺	10	125	6	10	10
Mg ²⁺	4	5	0,8	8	8
Ca ²⁺	0,015	-	-	0,02	0,02
Histidin	198	-	-	66	124
N-Acetylhistidin	-	-	-	68	57
TRIS	-	-	1	-	-
MOPS	-	-	-	-	-
Glycin	-	-	-	20	10
Alanin	-	-	-	10	5
Tryptophan	2	-	-	2	2
Arginin	-	-	-	2	3
Saccharose	-	-	-	79	33
Raffinose	-	30	-	-	-
Mannitol	30	-	-	-	-
HAES	-	50 g/l	-	-	-
Dextran	-	-	50 g/l	-	-
Allopurinol	-	1	-	-	-
Adenosin	-	5	-	-	-
GSH	-	3	-	-	-
Insulin	-	40 U/l	-	-	-
Dexamethason	-	16 mg/l	-	-	-
Penicillin	-	2*10 ⁵ U/l	-	-	-
Glukose	-	-	5	-	-
Desferal	-	-	-	-	0,025
LK 614	-	-	-	-	0,0075
pH	7,2	7,4	7,4	7,0	7,0
Osmolarität (mosm/l)	310,02	320	295	305,06	305,05

Die Konzentrationen aller Substanzen sind in mM angegeben, wenn nicht anders bezeichnet. Die modifizierte HTK (modif. HTK; Bahde, R. et al., 2008) stellt eine Zwischenstufe in der Entwicklung der neuen Organkonservierungslösung Custodiol-N (Rauen, U. et al., 2008) dar.

Dementsprechend wurde die UW-Lösung als Konservierungslösung vom intrazellulären Typ entwickelt. Die Zellschwellung soll durch den Einsatz des impermeablen Anions Lactobionat (100 mM), des kolloidosmotisch wirksamen Zusatzes Hydroxyethylstärke (50 g/l) und des Trisaccharides Raffinose (30 mM) verhindert werden. Die Perfadex-Lösung ist die älteste Organkonservierungslösung und beinhaltet Dextran (50 g/l) als osmotisch wirksame Substanz. Sie wurde Ende der 60er Jahre als extrazelluläre Lösung für die Nierenlagerung entwickelt (Brunius, U. et al., 1968) und verlor in diesem Einsatzgebiet Ende der 70er Jahre an Bedeutung, erlebte aber in den 80er Jahren eine Renaissance in der Lungenkonservierung (Keshavjee, S. H. et al., 1989), in der sie heute noch als Goldstandard gilt.

Die während der Konservierungszeit auftretende Ischämie kann zu verstärkter Glykolyse führen, so dass die Gefahr der exzessiven Lactatbildung besteht, was zur Azidose führt. Um dies zu verhindern enthalten die Konservierungslösungen Puffersysteme. Die UW-Lösung beinhaltet einen Phosphatpuffer (25 mM), die HTK-Lösung eine hohe Histidinkonzentration (198 mM) und die Perfadex-Lösung TRIS (1 mM). Weiterhin ist in der UW-Lösung Adenosin (5 mM) als Vorstufe für die ATP-Bildung enthalten. Als Substrate enthält die HTK-Lösung α -Ketoglutarat (1 mM) und die Perfadex-Lösung Glukose (5 mM). Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu verhindern, sind in der UW-Lösung zusätzlich Antioxidantien wie Glutathion (3 mM) und Allopurinol (1 mM), das die Xanthinoxidase kompetitiv hemmen soll, enthalten. Während die UW-Lösung als Hauptionen im Wesentlichen Kalium (125 mM) und Lactobionat (100 mM) enthält, ist die Perfadex-Lösung reich an Natrium (138 mM) und Chlorid (142 mM). Die ursprünglich für die Kardioplegie entwickelte HTK-Lösung enthält lediglich 50 mM Chloridionen und ist ansonsten ionenarm. Insbesondere die niedrige Kaliumkonzentration ist bei der HTK-Lösung von Vorteil, da bei der Reperfusion, im Vergleich zur UW-Lösung, nicht mit kardialen Nebenwirkungen gerechnet werden muss.

Die bereits oben erwähnten neuen Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen der Kälteschädigung bieten Möglichkeiten zur Verbesserung der Organlagerung, so dass, basierend auf der HTK-Lösung über Zwischenstufen (Bahde, R. et al., 2008) die neue Konservierungslösung Custodiol-N für die Lagerung von Organen, insbesondere der Leber, entwickelt wurde (Rauen, U. et

al., 2008). Die hohe Histidinkonzentration als Hauptkomponente der HTK-Lösung wurde teilweise durch *N*-Acetylhistidin ersetzt (Abbildung 2), da Histidin die Bildung eisenabhängiger hochreaktiver Sauerstoffspezies *in vitro* verstärkt (Rauen, U. et al., 2007). Um die Ausbildung unspezifischer Poren während der Kaltlagerung mit nachfolgendem Natriuminflux zu verhindern, wurden im Optimierungsprozess der Custodiol-N-Lösung die Aminosäuren Glycin und das strukturverwandte Alanin in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt (Rauen, U. et al., 2008). Die Chloridionen wurden hier partiell durch Lactobionat und Aspartat ersetzt, da Chloridionen in Konzentrationen von $\geq 40\text{-}50\text{ mM}$ bei der Lagerung isolierter Hepatozyten eine eisenunabhängige Schädigung verursachten (Rauen, U. et al., 2007). Die Zugabe von Aspartat soll im Sinne einer anaplerotischen Reaktion Intermediate des Citratcyclus bereitstellen.

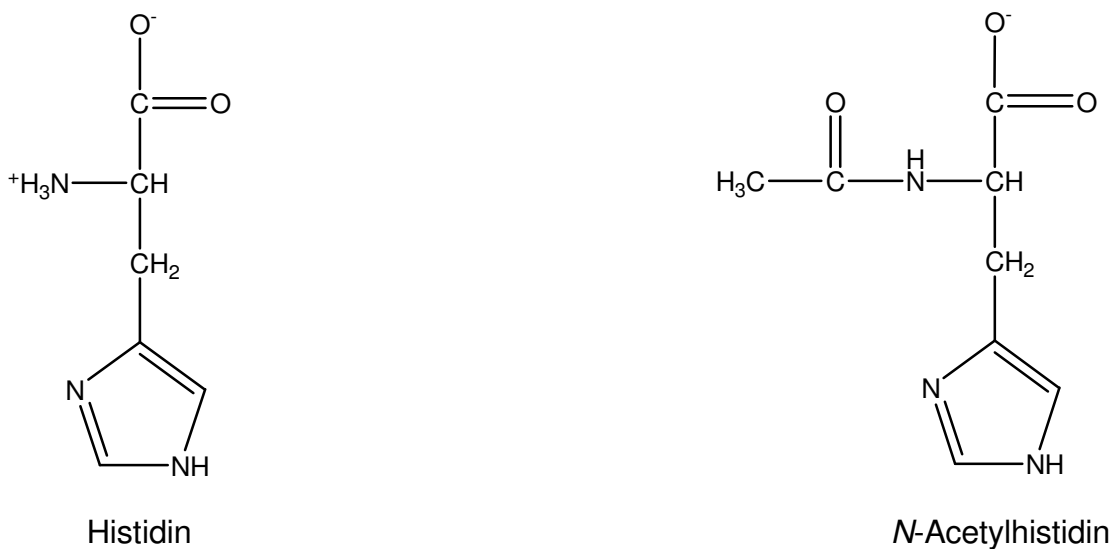


Abbildung 2. Strukturformeln von Histidin und *N*-Acetylhistidin.

Die aktuell klinisch eingesetzten Organkonservierungslösungen berücksichtigen in ihren Zusammensetzungen den Mechanismus der eisenabhängigen, kälteinduzierten Schädigung überhaupt nicht. Der neuen mechanismenorientierten Organkonservierungslösung wurden deswegen Eisenchelatoren hinzugefügt, um diese Komponente der Schädigung zu hemmen (Rauen, U. et al., 2008). Dazu wurden sowohl der klinisch etablierte hydrophile,

sechszählige Eisenchelator Desferal (Abbildung 3), der bei Eisenüberladung wie z.B. Hämochromatosen klinisch bereits seit Jahren zum Einsatz kommt, als auch das neusynthetisierte, lipophile Hydroxamsäurederivat LK 614 (Rauen, U. et al., 2007) eingesetzt.

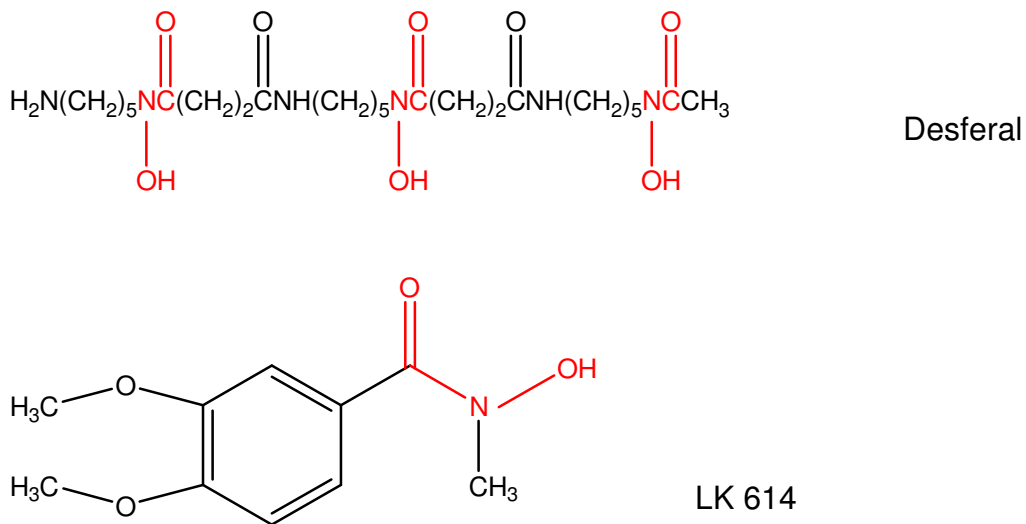


Abbildung 3. Strukturformeln des etablierten Eisenchelators Desferal und des neusynthetisierten Chelators LK 614.

Die chelatisierenden Hydroxamsäuregruppen sind jeweils in rot dargestellt.

1.4. Gefäßtransplantate und kalte Lagerung von Gefäßen

Gefäßhomo- und -allografts werden als Rekonstruktionsmaterial in kardiovaskulären Eingriffen (Zacharias, A. et al., 2004; Ferrari, E. R. et al., 2006) und der Transplantationschirurgie (Lopez Santamaria, M. et al., 1996; Zacharias, A. et al., 2004; Del Gaudio, M. et al., 2005) eingesetzt. In der kardiovaskulären Chirurgie werden freie Gefäßgrafts für kurze Zeit (Stunden) zwischen 4°C und Raumtemperatur in heparinisiertem Blut, physiologischer Kochsalzlösung oder Organkonservierungslösungen gelagert. Bei dieser Kurzzeitlagerung ist das Hauptziel, eine Aktivierung des Endothels zu verhindern, welche zu chronischer Entzündung, Obliteration und letzten Endes zum Verschluss des transplantierten Gefäßes führen kann (Welz, A. et al., 1991; Schaeffer, U. et al., 1997).

Weitere Indikationen zur Gefäßtransplantation sind primäre Gefäßinfektionen, sowie sekundäre Infektionen von alloplastischen Gefäßprothesen, die zwar vergleichsweise selten sind, aber das Leben Betroffener unmittelbar bedrohen (Kieffer, E. et al., 2004). Da das Risiko für Komplikationen an Gefäßen im Bereich der Organtransplantation, insbesondere bei Lebertransplantationen mit seltener, bei Eintritt aber schwerwiegender, Leberarterienthrombose, circa 11 Tage besteht (Pinna, A. D. et al., 1996) werden Spendergefäße über Tage gelagert. Gefäßallografts werden weiterhin als Verlängerung benutzt, wenn die anatomischen Strukturen präoperativ anders eingeschätzt wurden, als sich schlussendlich während der Operation herausstellt, sowie nach postoperativen Gefäßkomplikationen eingesetzt. Die Gefäße werden dazu bei Hypothermie in den Konservierungslösungen HTK, UW oder Perfadex gelagert (Wilson, C. H. et al., 2004), die vor über 25 Jahren ursprünglich für Organtransplantate entwickelt wurden.

Es wird dabei nicht berücksichtigt, dass der Mechanismus der Hypoxie und Reperfusion für Endothelzellen eine eher untergeordnete Rolle spielt, da Endothelzellen relativ hypoxieresistent sind (Buderus, S. et al., 1989; Mertens, S. et al., 1990; Rauen, U. et al., 1993; Rauen, U. et al., 1994) und hier die Komponente der kälteinduzierten, eisenabhängigen Schädigung im Vordergrund steht, gegen den die Konservierungslösungen HTK, UW und Perfadex nicht schützen.

2. Fragestellung

Der neue Mechanismus der kälteinduzierten, eisenabhängigen Schädigung ist bisher nur an isolierten und kultivierten Endothelzellen gezeigt worden, die keiner subendothelialen, bindegewebigen Matrix aufliegen und somit keiner „natürlichen Umgebung“ ausgesetzt sind. Es war daher zunächst zu zeigen, ob diese Schädigung auch im Zellverbund, wie in intakten Gefäßen, auftritt. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da die Zusammensetzungen der momentan klinisch eingesetzten Organkonservierungslösungen diesen Schädigungsmechanismus nicht berücksichtigen und in ihrer Entwicklung ursprünglich nicht für die Lagerung von Geweben wie Gefäßen konzipiert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, an einem (zu etablierenden) Gefäßmodell zu untersuchen, ob dieser Schädigungstyp der kälteinduzierten, eisenabhängigen Schädigung auch im Endothel von Gefäßen, also von Endothelzellen *in situ* auftritt, dann eine optimierte Gefäßkonservierungslösung zu entwickeln und anhand verschiedener Endothelzell-relevanter Parameter zu evaluieren.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Benzylpenicillin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
University of Wisconsin (UW)-Lösung Markenname: ViaSpan	Bristol-Myers Squibb (Princeton, USA)
Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)- Lösung Markenname: Custodiol LK 614 N-Acetylhistidin	Dr. F. Köhler Chemie (Alsbach- Hähnlein, Deutschland)
Physiologische Kochsalzlösung	Fresenius AG (Bad Homburg, Deutschland)
L-Glutamin M199-Medium Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
Pyren-FNOCT-Säure	Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen; Prof. em. Dr. Dr. h.c. Sustmann
Alanin Calciumchlorid Calciumchlorid-Dihydrat Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure (HEPES)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	
Insulin	
Kaliumchlorid	
Kaliumdihydrogenphosphat	
Kaliumhydroxid	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	
Natriumchlorid	
Natriumhydroxid	
Triton X-100	
5-(und-6)-Carboxy SNARF-1	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Acetoxymethylesteracetat (SNARF-1)	
Propidiumjodid	
Tetramethylrhodamin-Methylester- Perchlorat (TMRM)	
Deferoxaminmesilat (Desferal)	Novartis Pharma (Nürnberg, Deutschland)
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratorien (Linz, Österreich)
Dexamethason	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Kollagen	
Saccharose	
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Adenosin	
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	
Fötale Kälberserum	

Glukose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hoechst 33342	
Ionomycin-Calciumsalz	
Lactobionsäure	
L-Arginin	
L-Aspartat-Hemimagnesiumsalz	
Magnesiumoxid	
N ^G -Monomethyl-L-Arginin (NMA)	
Pluronic F-127	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Trolox	
Tryptophan	
α-Ketoglutarat-Natriumsalz	
MAHMA-NO	Situs-Chemicals (Düsseldorf, Deutschland)
Low-Potassium-Dextran-Lösung	Vitrolife (Kungsbacka, Schweden)
Markenname: Perfadex	

3.2. Behältnisse und sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
Deckgläschen	Assistent (Sondheim, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Röhrchen	
Polypropylengefäße (25 ml, steril)	Kartell (Mailand, Italien)

96-well Platten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Inkubationskammern	Feinmechanische Werkstatt des Universitätsklinikums Essen
Skalpelle	Feather Co (Tokyo, Japan)

3.3. Blutgefäße

Schweineaorten wurden vom örtlichen Schlachthof zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der normalen Schlachtung wurden 7 - 8 Monate alte Hausschweine mit einer elektrischen Zange betäubt und durch Ausbluten getötet. Die Aorten wurden unmittelbar nach dem Tod der Tiere entnommen und innerhalb von 30 Minuten in HBSS + 10 mM Glukose (Tabelle 2; Raumtemperatur) zur Präparation ins Labor transportiert.

Tabelle 2. Zusammensetzung der physiologischen Pufferlösung Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) + 10 mM Glukose.

HBSS + 10 mM Glukose	
NaCl	136,8 mM
KCl	5,3 mM
CaCl ₂	1,0 mM
MgCl ₂	0,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgSO ₄	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄	0,3 mM
HEPES	25,0 mM
D-Glukose	10,0 mM
pH	7,35

Der pH-Wert wurde bei 20°C eingestellt.

3.4. Zusammensetzung der Konservierungslösungen

Ausgehend von der im Labor entwickelten modifizierten HTK-Lösung wie sie für die experimentelle Organkonservierung getestet wird, wurden hier ähnlich modifizierte Lösungen eingesetzt, um zu untersuchen, in wie weit eine modifizierte Lösung, die an die Anforderungen der Lagerung kleinerer Gewebe angepasst ist, die kalte Lagerung von Blutgefäßen verbessern kann (Tabelle 3). Dabei wurde die für Gewebe unnötig hohe Pufferkapazität vermindert und die auftretende osmotische Lücke entweder mit Saccharose oder durch eine Erhöhung der Kationen (Kalium und Natrium) und Anionen (Chlorid und Lactobionat) aufgefüllt. Um Nebenwirkungen des neuen Puffers *N*-Acetylhistidin auszuschließen, wurde er in den Lösungen 2, 3 und 4 durch den Puffer MOPS ersetzt. Der pH-Wert wurde analog zu den Organkonservierungslösungen bei 20 °C eingestellt.

3.5. Versuche mit Aortensegmenten vom Schwein

Im Labor wurden die Aorten geprüft und angeschnittene Aorten sowie Aorten mit Resten von Lungengewebe verworfen. Die restlichen Aorten wurden in steriles HBSS mit Glukose gelegt, anschließend von Lymphknoten, Binde- und Fettgewebe befreit und danach noch mehrere Male mit sterilem HBSS + 10 mM Glukose (Raumtemperatur) gewaschen. Danach wurde die Aorta longitudinal eröffnet, das hintere Viertel der Aorta mit den Abgängen der Interkostalarterien entfernt (Abbildung 4) und dann in circa 2 cm lange Stücke geschnitten, die für 2 bis 21 Tage bei 4 °C in 25 ml HTK-, UW-, Perfadex-, physiologischer Kochsalzlösung oder in modifizierten Lösungen (Tabelle 3) mit oder ohne die Eisenchelatoren Desferal und/oder LK 614 in sterilen Polypropylen-Behältern gelagert wurden. Alle Lösungen wurden mit Penicillin (50 U/l) und Streptomycin (50 µg/ml) supplementiert. Wenn nach Lagerung auch nur in einzelnen Ansätzen Anzeichen für eine bakterielle Kontamination vorlagen (z.B. Trübung der Lösung, Film auf der Oberfläche der Lösung, Geruch oder mikroskopischer Nachweis von Bakterien), wurde das ganze Experiment verworfen; alle Aortensegmente vom entsprechenden Präparationstag entsorgt und die betroffenen Versuchsreihen wiederholt.

Tabelle 3. Zusammensetzung der Lösungen

	HTK	Lsg.1	Lsg. 2	Lsg. 3	Lsg. 4	Lsg. 5	Lsg. 6	Lsg. 7	Lsg. 8	Lsg. 9	Lsg. 10	UW	Perfadex
Cl ⁻	50	8,1	8,1	8,1	95,1	94,1	94,1	94,1	103,1	103,1	97,1	-	142
H ₂ PO ₄ ⁻	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25	0,8
SO ₄ ²⁻	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	5	0,8
α-Ketoglutarat	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-
Aspartat	-	8	7,5	7,5	7,5	8	8	8	5	5	5	-	-
Lactobionat	-	-	-	87	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Na ⁺	15	16	16	103	103	103	103	16	16	104	16	25	138
K ⁺	10	6	6	6	6	6	6	93	93	5	93	125	6
Mg ²⁺	4	6	6	6	6	6	6	6	8	8	8	5	0,8
Ca ²⁺	0,015	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	-	-
Histidin	198	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetylhistidin	-	30	-	-	-	30	30	30	30	30	30	-	-
TRIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
MOPS	-	-	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycin	-	20	20	20	20	20	5	5	10	10	10	-	-
Alanin	-	10	10	10	10	10	-	-	5	5	5	-	-
Tryptophan	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-
Saccharose	-	182	190,5	16,5	16,5	12	37	37	20	20	26	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
Mannitol	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HAES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50 g/l	-
Dextran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50 g/l
Allopurinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Adenosin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-
GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Insulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40 U/l	-
Dexamethason	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16 mg/l	-
Penicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2*10 ⁵ U/l	-
Glukose	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	5
pH (20°C)	7,2	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,4	7,4	7,4
Osmolarität (mosm/l)	310,02	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	305,15	320	295

Die Konzentrationen aller Substanzen sind in mM angegeben, wenn nicht anders bezeichnet. Zur besseren Übersicht sind hier die klinisch eingesetzten Lösungen noch einmal aufgeführt. **Eine zusätzliche herausnehmbare Tabelle befindet sich am Ende der Arbeit.**

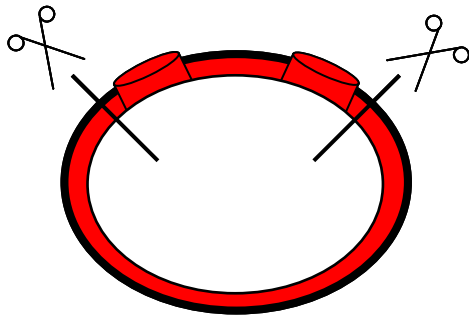


Abbildung 4. Longitudinale Eröffnung mit Entfernung des hinteren Aortenviertels.

An den Schweineaortensegmenten wurde der Zeitverlauf der Gefäßendothelzellschädigung sowie seine mögliche Eisenabhängigkeit untersucht (Abbildung 5). Danach wurde die Basislösung optimiert (hinsichtlich Puffersystem, pH-Wert, Hauptkation, Hauptanion, Ionenstärke). Dann wurden die Chelatoren und deren Konzentrationen optimiert und die Basislösungen mit den optimierten Chelatorkonzentrationen erneut getestet. Zum Schluss wurden die optimierten Lösungen gegen momentan klinisch genutzte Lösungen getestet. Zusätzlich zu den Parametern der Zellschädigung wurde vor und nach Lagerung mit einem pH-Meter (765 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland) jeweils bei 4 °C der pH-Wert der Konservierungslösungen gemessen.

3.6. Bestimmung der Vitalität der Endothelzellen in Gefäßsegmenten

Ein Teil der Segmente wurde unmittelbar nach Kaltlagerung untersucht, der andere Teil nach dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose. Das in die DNA interkalierende Hoechst 33342 (Abbildung 6) markiert die Kerne aller Zellen (blaue Fluoreszenz). Im Gegensatz dazu ist Propidiumjodid (Abbildung 6) impermeabel für die Plasmamembran, gelangt jedoch in nekrotische und spätapoptotische Zellen und interkaliert dort in die DNA, sodass die Kerne dieser Zellen rot fluoreszieren. Um eine Simultandetektion zu ermöglichen, wurde eine Filterkombination eingesetzt, die den Grünanteil des blau fluoreszierenden Hoechst 33342 betonte, so dass die Fluoreszenz der Kerne lebender Endothelzellen grün erschien, die der Kerne toter Endothelzellen eine orange Mischfluoreszenz erzeugte.

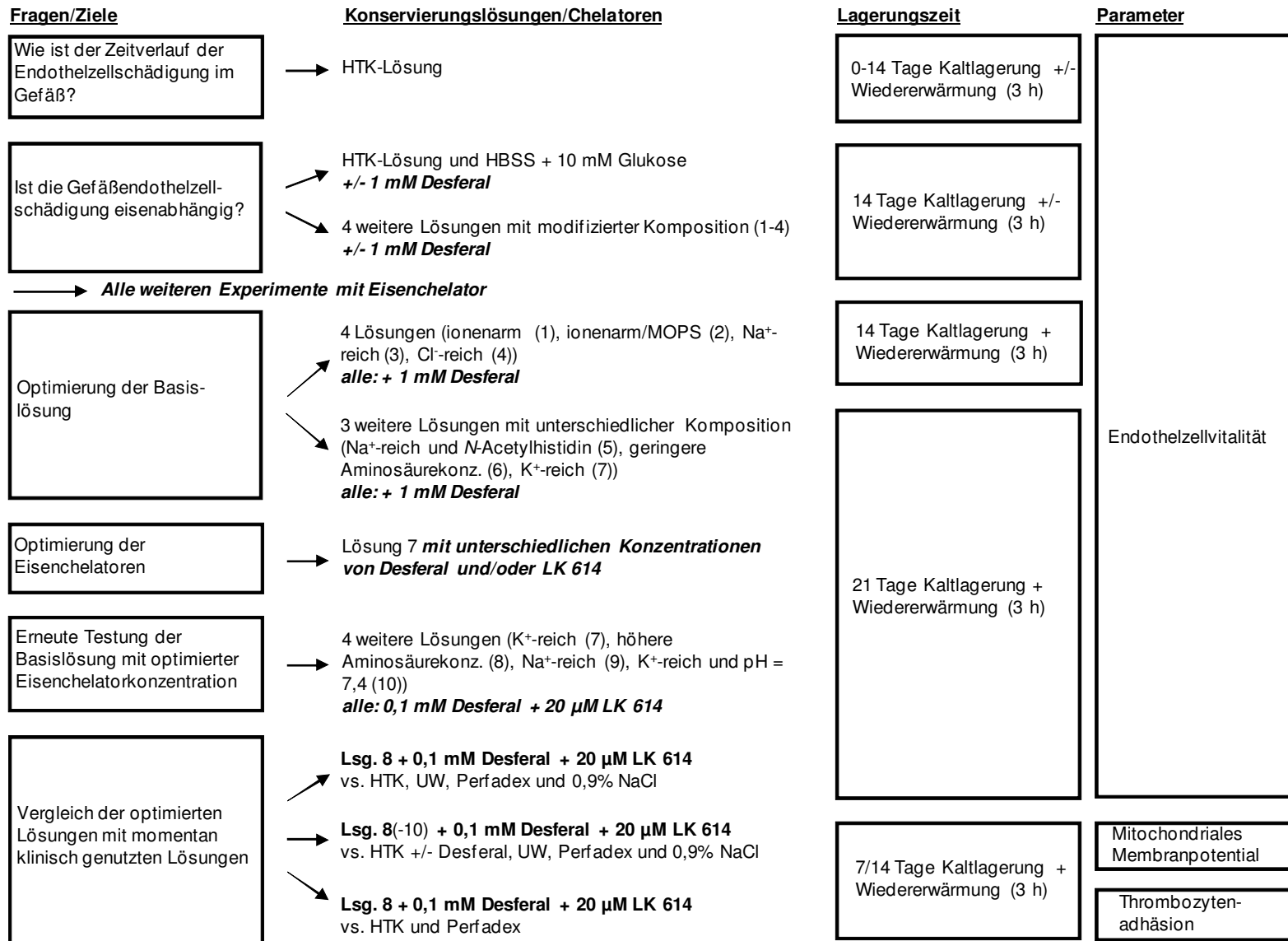


Abbildung 5. Schema zum Protokoll der Blutgefäßversuche.

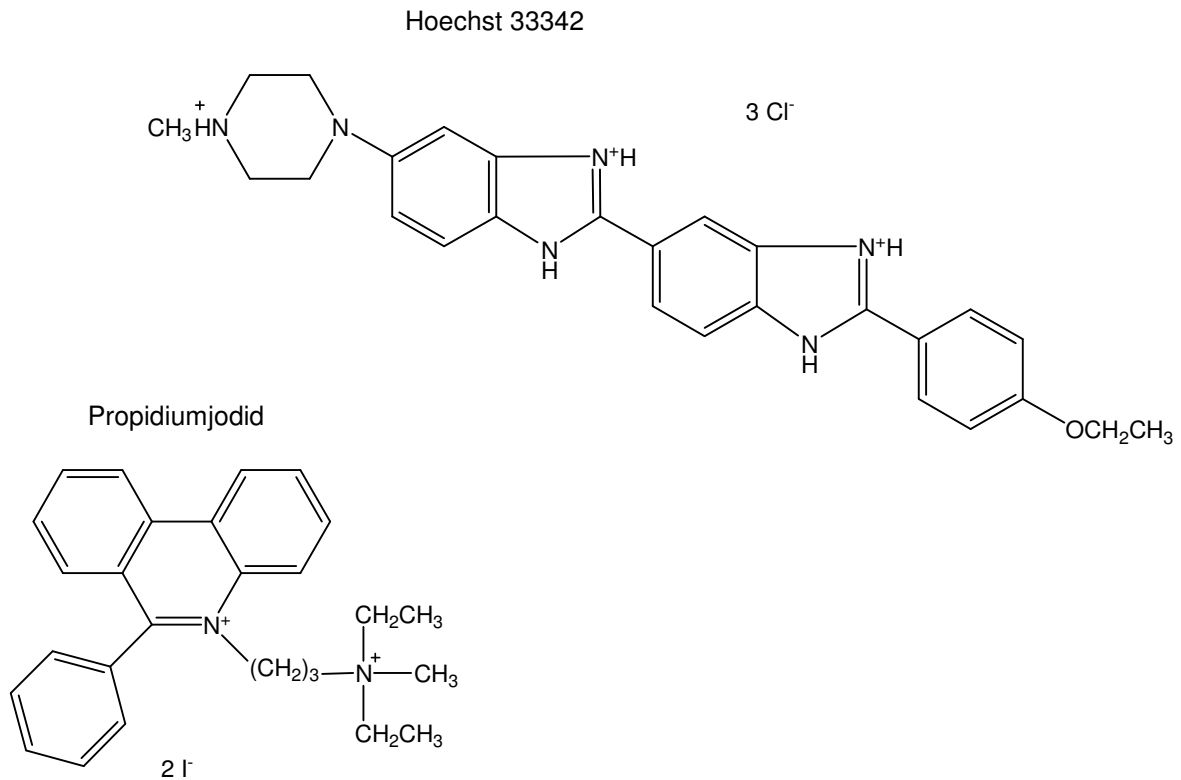


Abbildung 6. Strukturformeln der Fluoreszenzfarbstoffe für die Vitalitätsfärbung.

Der prozentuale Anteil toter (Propidiumjodid-positiver) Endothelzellen der Aortensegmente wurde mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie (Axiotech, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ermittelt. Dazu wurden die Segmente mit 0,5 - 5 µg/ml Propidiumjodid für 1 - 15 Minuten und mit 0,1 - 2 µg/ml Hoechst 33342 für 5 - 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Segmente vorsichtig, mit dem Endothel nach oben zeigend, mit Kanülen auf Gummipplatten fixiert und wieder in mit 25 ml HBSS + 10 mM Glukose gefüllte Polypropylengefäße gestellt. Das Gefäßendothel wurde bei 400-facher Vergrößerung mittels Wasserimmersionsobjektiv (Achroplan 40x, Zeiss) bei $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \pm 12,5$ nm, Strahlenteiler 490 nm, $\lambda_{\text{em.}} \geq 515$ nm in 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Präparat untersucht.

3.7. Bestimmung funktioneller Parameter

3.7.1 Mitochondriales Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential wurde mittels Färbung der Aortensegmente mit dem mitochondrienselektiven, kationischen Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat (TMRM) ermittelt (Abbildung 7). Auf Grund seiner delokalisierten positiven Ladung akkumuliert TMRM abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in den Mitochondrien. Die Stärke der Akkumulation und damit die Fluoreszenzintensität in den Mitochondrien ist hierbei von der Höhe des mitochondrialen Membranpotentials abhängig. Schweineaortensegmente wurden für 7 oder 14 Tage in 25 ml HTK, HTK + 1 mM Desferal, physiologischer Kochsalzlösung, Perfadex, UW und drei modifizierten Lösungen (Lösung 8, 9, 10 mit optimierten Chelatorkonzentrationen; Tabelle 3) bei 4°C gelagert. Nach 150 Minuten Wiedererwärmung (37°C) der Segmente in HBSS + 10 mM Glukose, wurden die Segmente für 15 - 60 Minuten in HBSS + 10 mM Glukose + TMRM (100 - 500 nM) bei 37°C inkubiert. Danach wurde das HBSS + 10 mM Glukose erneuert und als Erhaltungsdosis 100 - 250 nM TMRM hinzugefügt. Die Gefäßsegmente wurden vorsichtig in längliche Streifen geschnitten, um ebenere Präparate zu bekommen und behutsam mit dem Endothel nach unten in Inkubationskammern mit Deckglasboden gelegt, um eine mechanische Schädigung der Mitochondrien zu verhindern. Anschließend wurde mit einem inversen, konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510, Zeiss), ausgestattet mit einem Heliumlaser, die Gesamtfluoreszenz der Endothelzellmitochondrien untersucht. Dazu wurde mit der Software des Laserscanningmikroskops der Anteil positiver Pixel ungelagerter Kontrollsegmente ermittelt, als Ausgangswert definiert und mit den gemessenen positiven Pixeln nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung der Aortensegmente in den verschiedenen Lösungen verglichen (% der Kontrolle). Die Messungen wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 630-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 63x, Zeiss) mit $\lambda_{exc.} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 585 \text{ nm}$ bei 90 μm Pinhole durchgeführt, so dass die Schichtdicke ca. 0,7 μm betrug. Zusätzlich wurden Versuche zur mitochondrialen Morphologie nach Lagerung in Lösung 8 unmittelbar nach

Kaltlagerung (hier Verlängerung der Farbstoffinkubation auf 1 - 4 Stunden) und nach 3 Stunden Wiedererwärmung durchgeführt.

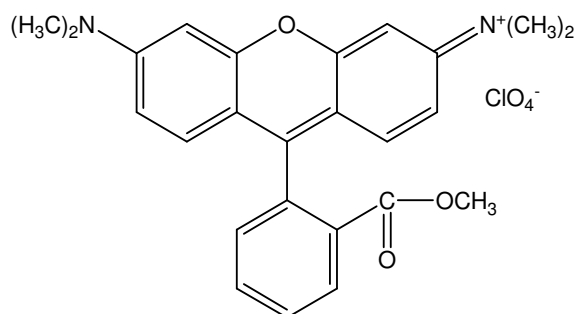


Abbildung 7. Strukturformel des mitochondrienselektiven Farbstoffs Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat (TMRM).

3.7.2. Bestimmung der endothelialen Stickstoffmonoxidfreisetzung (NO) mit Pyren-FNOCT

Eine wichtige Funktion des Gefäßendothels ist die Stickstoffmonoxid (NO)-Bildung, die über die glatte Muskelschicht die Vasokonstriktion und -relaxation (Ignarro, L. J. et al., 1987) reguliert. Weiterhin vermindert NO unmittelbar die Thrombogenität (Palmer, R. M. et al., 1988). Die Synthese von NO in den Endothelzellen erfolgt durch die membranständige endotheliale NO-Synthase (eNOS). Dabei wird in einer NADPH-abhängigen Oxidation, mittels der dimeren NO-Synthase, einem Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Enzym, NO aus Arginin synthetisiert und steuert dort über die Aktivierung einer Guanylat-Cyclase die Bildung des Second Messengers cGMP und so die Gefäßmuskelrelaxation (Moncada, S. et al., 1991). Nach Kaltlagerung von Endothelzellen ist die NO-Freisetzung vermindert und führt so zu einer erhöhten Thrombogenität (Redondo, J. et al., 2000). Deswegen wurde hier versucht, die vergleichsweise geringe NO-Freisetzung der konstitutiven endothelialen NOS von Gefäßsegmenten mittels Pyren-FNOCT, einem neuen NO-selektiven Fluoreszenzindikator, direkt zu messen. Das Grundprinzip der NO-Messung mittels FNOCT ist die Reaktion des o-Chinodimethans des Pyren-FNOCT mit NO, die ein Nitroxidradikal generiert (Abbildung 8).

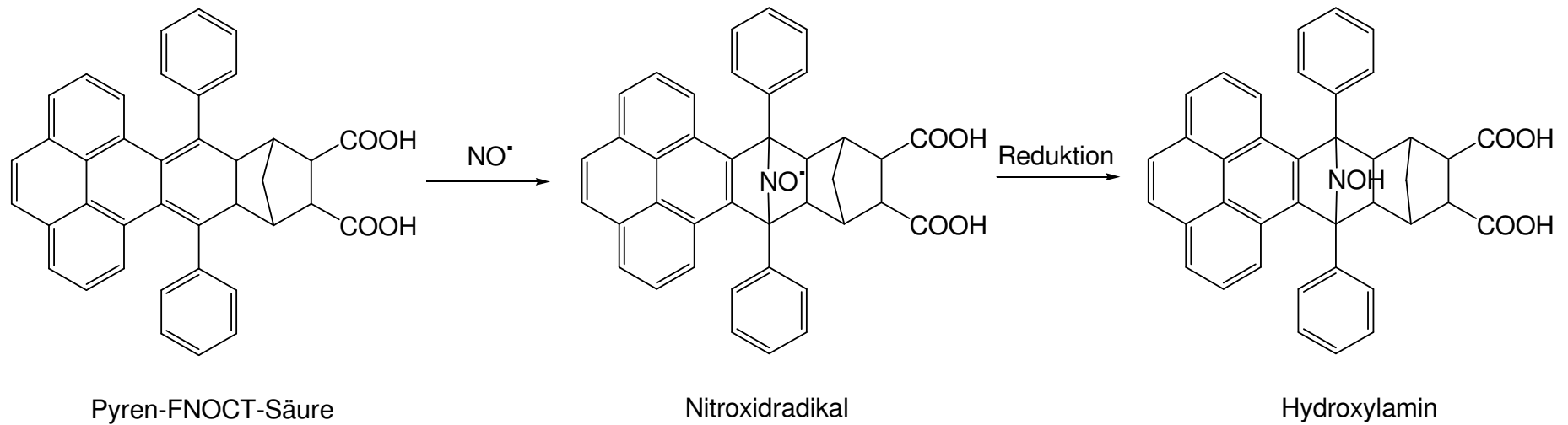


Abbildung 8. NO-Abfang durch Pyren-FNOCT-Säure.

Das Grundprinzip ist die Reaktion des o-Chinodimethans des Pyren-FNOCT-Säure mit NO, welches so das Nitroxidradikal generiert. Nach Bildung des Nitroxidradikals kann ein schneller Fluoreszenzanstieg detektiert werden, der auf Grund der Rearomatisierung des o-Chinodimethans nach der Abfangreaktion entsteht und so für die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$ sorgt.

Beim Abfang von NO bildet sich ein Pyrenringssystem und sorgt somit für die Fluoreszenz. Um die freigesetzte NO-Menge messen zu können, wurden Inkubationskammern mit einem Innendurchmesser von 1,67 cm entworfen, die exakt 2,2 cm² des Gefäßendothels einfassten. Die Kammern waren zur Endothelseite hin scharfkantig und wurden mit zwei Kanülen so fixiert, dass sich eine auslaufsichere Kammer bildete (Abbildung 9).

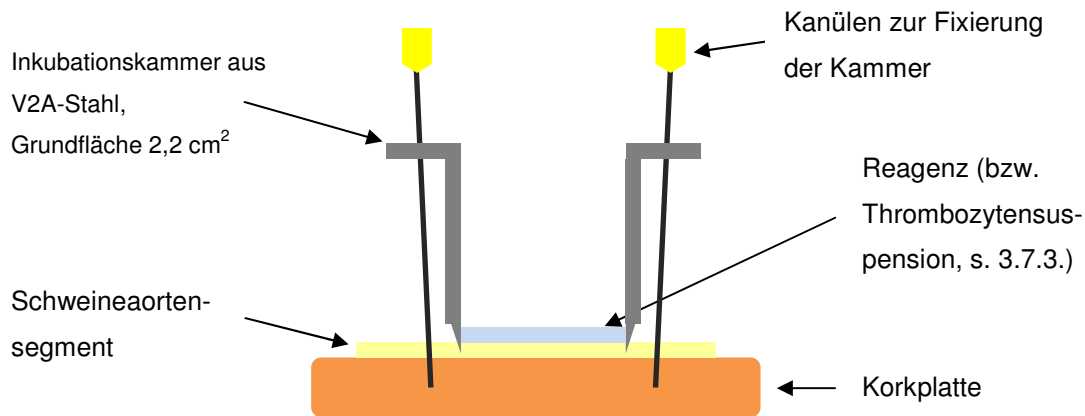


Abbildung 9. Inkubationskammer für Pyren-FNOCT und Thrombozytenadhäsionsversuche.
Foto der Inkubationskammer zusätzlich in Abbildung 11 unten rechts.

Es wurde in drei Ansätzen geprüft, in wie weit das Endothel frischer Aorten messbar NO freisetzt. Hierzu wurde ein Ansatz mit N^G-Monomethyl-L-Arginin (NMA) 30 Minuten vorinkubiert (0,1 mM), um mittels Einsatz dieses kompetitiven L-Arginin-Antagonisten die NO-Freisetzung zu hemmen (Tabelle 4). Ein anderer Ansatz enthielt L-Arginin (0,5 mM) als eNOS-Substrat. Der dritte Ansatz enthielt sowohl L-Arginin (0,5 mM) als auch das Calciumionophor Ionomycin (10 µM) in der Annahme, dass der damit verbundene Calciumanstieg aufgrund der Calciumabhängigkeit der eNOS eine höhere NO-Freisetzung bewirkt. Diese Ansätze wurden analog in HBSS + 10 mM Glukose vorinkubiert und anschließend, wie die restlichen Proben 30 Minuten bei 37°C mit dem Pyren-FNOCT-Versuchsansatz inkubiert. Der Pyren-FNOCT-Versuchsansatz enthielt weiterhin den extrazellulären Eisenchelator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA; 100 µM), um einen langsamen Anstieg der Backgroundfluoreszenz des Pyren-FNOCT zu verhindern (Rauen, U. et al. 2006, unveröffentlichte Ergebnisse). Zur Reduktion

des Nitroxidradikals zum Hydroxylamin enthielt der Ansatz Trolox (100 µM), da intrazelluläre natürliche Reduktionsmittel wie Thiole bei extrazellulären Messungen/Überstandsmessungen nicht zur Verfügung stehen, Ascorbat zu einem Anstieg der Backgroundfluoreszenz führte und Glukose ein zu schwaches Reduktionsmittel ist (Hornig, F. S. et al., 2006). Das Pyren-FNOCT (Pyren-FNOCT-Säure, 50 µM) wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn zusammen mit dem Lösungsvermittler Pluronic (0,02%) vorgemischt, um eine Aggregation und Excimerbildung des Fängermoleküls zu verhindern (Mohr, A. et al., 2007), und zu HBSS + 10 mM Glukose hinzugegeben, da Pyren-FNOCT in gelöster Form nur eine begrenzte Stabilität aufweist. Von dem auf 37 °C erwärmten Versuchsreagenz wurden jeweils 400 µl in die speziell angefertigten Inkubationskammern (Abbildung 9) gegeben und für 30 Minuten Versuchszeit im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden zellfreie Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoffgemisch sowie den einzelnen Zusätzen als Kontrollen mitgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 300 µl Probe des Überstandes abgenommen und mittels Mikroplattenreader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) bei 37 °C und $\lambda_{exc.} = 340 \pm 10$ nm, $\lambda_{em.} = 400$ nm bei definierter Detektorempfindlichkeit (Gain) des Mikroplattenreaders über 14 Minuten (Messung alle 47 Sekunden) als Doppelwertbestimmung gemessen.

Tabelle 4. Ansätze zur NO-Messung im Endothel nicht gelagerter Schweineaortensegmente.

	NMA	L-Arg	L-Arg + Ionomycin
Vorinkubation	+ 0,1 mM NMA	-	-
Inkubation mit Pyren-FNOCT	+ 0,1 mM NMA	+ 0,5 mM L-Arg	+ 0,5 mM L-Arg + 10 µM Ionomycin

Frisches Schweineaortenendothel wurde auf die Fähigkeit zur NO-Freisetzung und Messbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pyren-FNOCT (50 µM) in HBSS + 10 mM Glukose (Tabelle 2) untersucht. Der N^G-Monomethyl-L-Arginin-Ansatz (NMA) diente als Negativkontrolle. Der L-Arginin-Ansatz (L-Arg) enthielt als Substrat 0,5 mM L-Arginin, der L-Arginin-Ansatz + Ionomycin (L-Arg + Ionomycin) zusätzlich das Calciumionophor Ionomycin (10 µM). Alle Ansätze enthielten DTPA (100 µM), Pluronic (0,02%) und Trolox (100 µM).

Um aus den Fluoreszenzmessungen den Effekt von den L-Arginin- bzw. L-Arginin + Ionomycin-Ansätzen berechnen zu können, wurde für jeden Versuch Δ Fluoreszenz berechnet. Dazu wurden von den gemessenen Fluoreszenzwerten der L-Arginin- bzw. L-Arginin + Ionomycin-Ansätzen die jeweiligen N^G-Methyl-L-Arginin-Fluoreszenzwerte als Negativkontrollen subtrahiert und die Differenz der zellfreien Kontrollen berücksichtigt.

3.7.3. Thrombozytenadhäsion

Nach Kaltlagerung kommt es in isolierten Endothelzellen zur erhöhten Expression des von-Willebrand-Faktors und vermehrter Anlagerung aktivierter Thrombozyten an Endothelzellen (Upadhyya, G. A. et al., 2002). Durch Schädigung oder Ablösung von Endothelzellen, tritt bei niedrigen Scherkräften eine unmittelbare Wechselwirkung mit den darunter liegenden subendothelialen Matrixproteinen wie Kollagen und Laminin auf (Berndt, M. C. et al., 2001). Bei hohen Scherkräften, wie in arteriellen Gefäßen kommt es indirekt über den von Endothelzellen gebildeten von-Willebrand-Faktor zur Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an Kollagen und so zur primären Hämostase. Deswegen wurde hier als weiterer funktioneller Parameter die Thrombozytenadhäsion untersucht. Humane und porcine Thrombozyten wurden aus Citratblut isoliert wie von McNicol et al. beschrieben (McNicol, A., 1996). Die humanen Thrombozyten wurden dem Experimentator, die porcinen während Operationen an Hausschweinen im zentralen Tierlabor abgenommen. Das Citratblut wurde anschließend für 5 Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das thrombozytenreiche Plasma abpipettiert. Danach wurden die Thrombozyten bei 2000 x g für 12 Minuten ohne Dichtgradient zentrifugiert, anschließend das Pellet wieder in frischem Thrombozytenpuffer resuspendiert (Tabelle 5) und für 15 - 60 Minuten mit 0,5 - 2 μ M SNARF-1-AM (Abbildung 10) bei 37°C beladen. Schweineaortensegmente, die 14 Tage in HTK, Perfadex und in der optimierten Lösung 8 + 0,1 mM Desferal + 20 μ M LK 614 (s.u.) kalt gelagert wurden, wurden unmittelbar nach Kaltlagerung bzw. nach 150 Minuten Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose mit den SNARF-1 gefärbten Thrombozyten (mindestens 410 x 10⁶ Thrombozyten/ml, gezählt in

Neubauer-Zählkammer) für 10 - 30 Minuten in Inkubationskammern weiterinkubiert (Abbildung 11).

Tabelle 5. Zusammensetzung des Thrombozytenpuffers.

Thrombozytenpuffer	
NaCl	134 mM
NaHCO ₃	12 mM
KCl	2,9 mM
Na ₂ HPO ₄	0,34 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
Glukose	5 mM
Bovines Serumalbumin	0,3 g/100 ml
pH	7,4

Der pH-Wert wurde bei 37°C eingestellt.

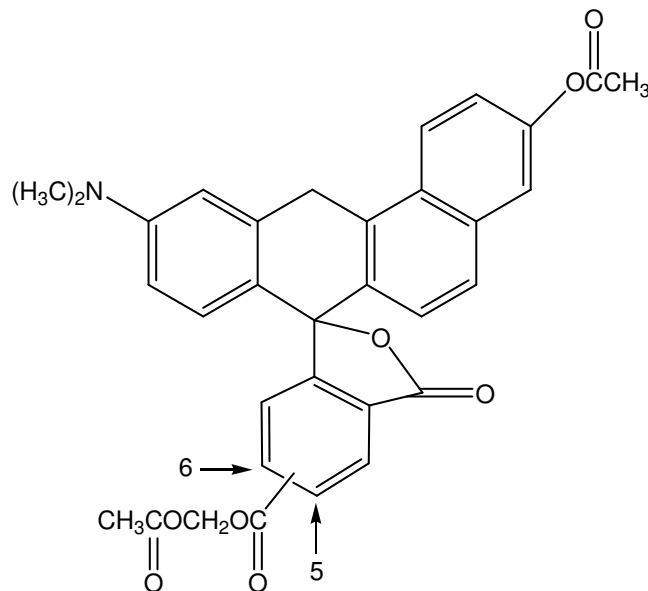


Abbildung 10. Strukturformel des cytosolischen Farbstoffs 5-(und-6)-Carboxy SNARF-1, Acetoxymethylesteracetat (SNARF-1-AM).

Danach wurden die Segmente mehrmals kräftig mit HBSS + 10 mM Glukose gewaschen, um nicht anhaftende Thrombozyten zu entfernen. Es wurden

die anhaftenden Thrombozyten von 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern/Präparat per Intravitalfluoreszenzmikroskopie mit einem Wasserimmersionsobjektiv bei 630-facher Vergrößerung (Achromplan 63x, Zeiss) bei $\lambda_{exc.} = 543 \text{ nm}$, Strahlenteiler 580 nm, $\lambda_{em.} \geq 590 \text{ nm}$ ausgezählt.

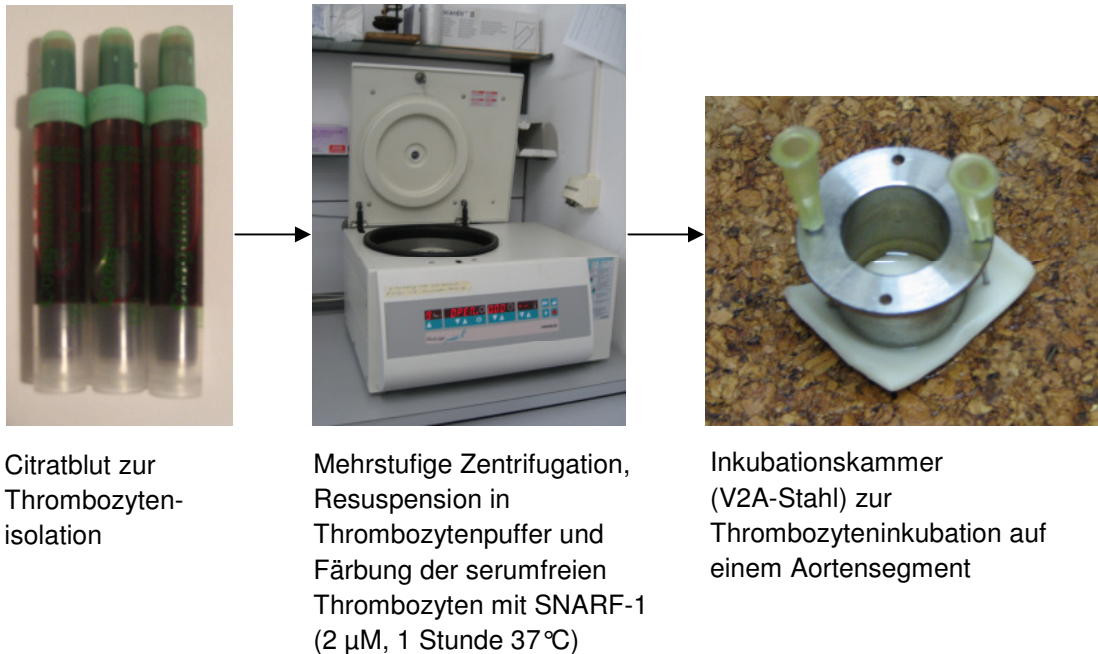


Abbildung 11. Prinzip der Thrombozytenisolation, -färbung und -inkubation.

3.8. Ergänzende Versuche mit isolierten Schweineaortenendothelzellen

Um abzuklären, ob die an den Aortensegmenten erhaltenen neuen Befunde zur Erfordernis von extrazellulärem Chlorid modellspezifisch sind oder auch bei isolierten (Aortenendothel-) Zellen nachvollziehbar (und damit untersuchbar) sind, wurden zusätzliche Versuche mit isolierten Endothelzellen durchgeführt. Freipräparierte Aorten wurden longitudinal eröffnet und das hintere Viertel der Aorten mit den Abgängen der Interkostalararterien entfernt (Abbildung 4). Anschließend wurden die Aorten mit Kanülen fixiert und die Endothelzellschicht nach wiederholtem Spülen mit sterilem HBSS + 10 mM Glukose (Kontamination der Kulturen durch Mikrobiologie ließ sich durch mehrere Waschvorgängen minimieren), vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt (Abbildung 12).

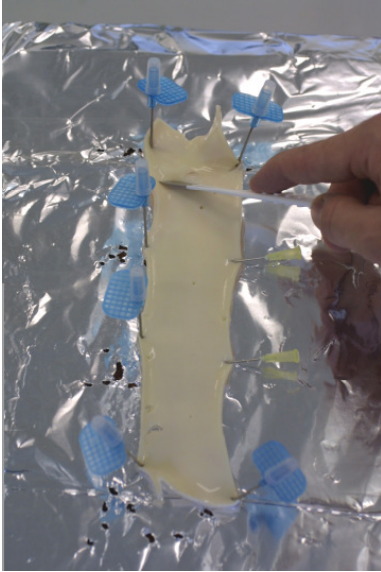


Abbildung 12. Abschaben der Endothelzellschicht einer aufgespannten Aorta.

Eine freipräparierte, longitudinal eröffnete, mit Kanülen aufgespannte Aorta wird vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt.

Durch einmaliges Abschaben unter leichtem Druck wurde eine Ablösung von Fibroblasten vermieden (Peters, S. C. et al., 2005). Die abgeschabten Endothelzellen von 1 - 2 Aorten wurden in 30 ml serumfreiem M199-Medium in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen, für 10 Minuten bei $250 \times g$ zentrifugiert und anschließend in 30 ml sterilem M199-Medium mit 20% fötalem Kälberserum, 250 U/ml Penicillin und 250 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin resuspendiert. Anschließend wurden 5 ml der Zellsuspension mit 15 ml Medium 199 mit 20% fötalem Kälberserum, 250 U/ml Penicillin und 250 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin zusammen in ein unbeschichtetes 75 cm^2 -Kulturfläschchen gegeben. Nach 5 Stunden wurden die frisch kultivierten Endothelzellen mit HBSS gewaschen, um Zelldetritus und nicht anhaftende Zellen zu entfernen und das Zellmedium erneuert. Nach drei bis sechs Tagen waren die Zellen konfluent und wurden mit 3 ml Trypsin (0,25%) für 3 Minuten bei 37°C inkubiert und im Verhältnis 1:3 auf kollagenbeschichtete $12,5 \text{ cm}^2$ -Kulturfläschchen subkultiviert. Als weitere Endothelzellen wurden kultivierte Leberendothelzellen untersucht (Rauen, U. et al., 1993). Die Endothelzellen wurden vor Versuchsbeginn dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend für 3 bis 14 Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit kaltem HBSS gewaschen, kaltes Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben und bei 37°C 3 Stunden wiedererwärmt. Als Schädigungsparameter wurde der Verlust der Plasmamembranintegrität und die damit verbundene Freisetzung der

cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH) in das umgebende Medium bestimmt (Jauregui, H. O. et al., 1981). Zur Bestimmung der freigesetzten (extrazellulären) LDH-Aktivität wurden zu definierten Zeiten Proben des Inkubationsmediums genommen und die LDH-Aktivität mit Hilfe des Vitalab Selectra E Analysenautomaten (Vital Scientific, Dieren, Niederlande) photometrisch gemessen. Am Versuchsende wurden die Zellen 20 Minuten bei 37 °C mit 2 ml des Detergens Triton X-100 (1% in HBSS) lysiert, um so die Gesamt-LDH-Aktivität bestimmen zu können. Das Ausmaß der Zellschädigung wurde als Prozentsatz der extrazellulären LDH-Aktivität von der Gesamtaktivität angegeben. Als weiterer Parameter wurde die zelluläre Morphologie mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (IM 35, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung untersucht. Die zelluläre Morphologie wurde optisch beurteilt und mittels einer digitalen Kamera (Typ EOS D30, Canon, Tokio, Japan) photographisch dokumentiert.

3.9. Statistik

Alle Untersuchungen an Schweineaorten wurden mit mindestens 4 Segmenten von verschiedenen Aorten und unterschiedlichen Präparationstagen durchgeführt. Zellkulturversuche mit Aortenendothelzellen und Leberendothelzellen wurden mindestens viermal mit Zellen unterschiedlicher Zellisolationen wiederholt. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Daten aus zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden mit dem Students' *t*-Test verglichen. Bei Vergleichen zwischen mehr als zwei Gruppen wurde eine Multivarianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni post hoc-Vergleich durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Die abgebildeten morphologischen Veränderungen sind jeweils repräsentativ für die durchgeführten Experimente.

4. Ergebnisteil

4.1. Etablierung der Nachweisverfahren

Auf Grund der Komplexizität des Gefäßmodells mussten die meisten in Zellkulturen etablierten Untersuchungen hier stark angepasst oder neu etabliert werden.

4.1.1. Vitalitätsuntersuchungen

Die besten Ergebnisse wurden nach Färbung mit 5 µg/ml Propidiumjodid für 5 Minuten und mit 1 µg/ml Hoechst 33342 für 15 Minuten bei 37°C erreicht. Bei Färbungen in der Kälte waren auf Grund der langsamen Färbekinetik und der hohen Eigenfluoreszenz der Aorta (Abbildung 13, rechts) die Färbungen schlechter. Nach Verlängerung der Inkubationszeit mit Hoechst 33342 auf 30 Minuten war die Färbung gut, so dass in den nachfolgenden Vitalitätsversuchen 4.2. – 4.8. die o.g. optimierten Parameter verwendet wurden. Durch die hohe Auflösung und den kurzen Arbeitsabstand des Objektivs musste jedes Präparat durchgescannt werden, um physiologische Unebenheiten im Gefäßsegment auszugleichen und sämtliche Endothelzellkerne in allen Ebenen erfassen zu können. Wurden Aortensegmente unmittelbar nach Präparation und Färbung untersucht, hatten weniger als 1% der Endothelzellkerne Propidiumjodid aufgenommen.

4.1.2. Mitochondriales Membranpotential

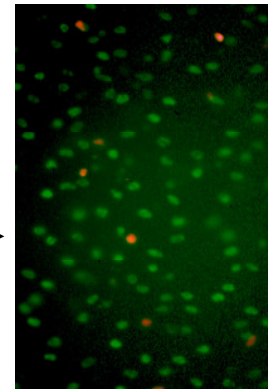
Eine optimale mitochondriale Beladung mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff TMRM wurde nach 30 Minuten Beladung mit 500 nM bei 37°C und 250 nM TMRM als Erhaltungsdosis erreicht (Abbildung 14 a). Eine gute Beurteilung der mitochondrialen Morphologie bei 4°C war nach Verlängerung der Beladungszeit



Für die Färbung präpariertes Aortenstück



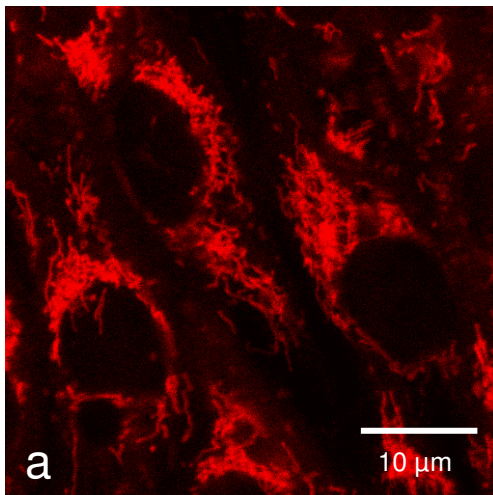
Intravitalfluoreszenzmikroskop mit Wasserimmersionsobjektiv und Präparat



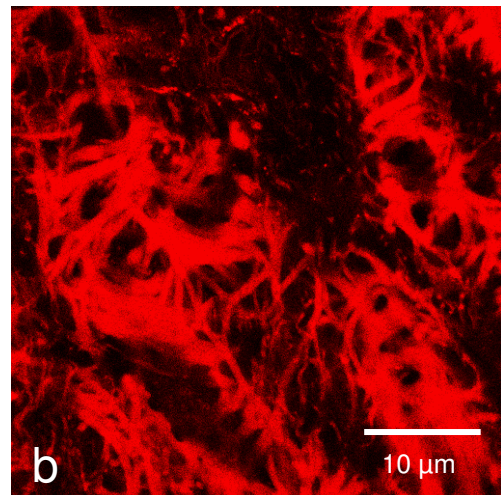
Hoechst 33342: membranpermeabler Kernfarbstoff (färbt Nuclei aller Endothelzellen)

Propidiumjodid: membranimpermeabler Kernfarbstoff (färbt Nuclei toter Endothelzellen)

Abbildung 13: Versuchsaufbau und Beispiel der Vitalitätsuntersuchungen.



a Optimierte Färbung eines frischen Kontrollsegments mit langen, dünnen Mitochondrien, die sich jeweils um den Zellkern gruppieren.



b Anfärbung der subendothelialen Matrix durch TMRM bei zerstörtem Endothelzellmonolayer

Abbildung 14: TMRM-gefärbte Aortensegmente.

auf 4 Stunden möglich, so dass diese Färbungsparameter bei den Untersuchungen zum mitochondrialen Membranpotential und der mitochondrialen Morphologie in 4.9. verwendet wurden. Bei Schädigungen des Endothelzellmonolayers kam es zur Anlagerung des kationischen TMRMs an die viele negative Ladungen tragende subendotheliale Matrix (Abbildung 14 b). Da nach Anfärbung mit TMRM auch eine schwache Fluoreszenz des extramitochondrialen Bereichs vorlag, wurde für die Quantifizierung der Mitochondrien mit erhaltenem mitochondrialen Membranpotential ein Schwellenwert oberhalb dieses extramitochondrialen Backgrounds gefärbter Schweineaortensegmente festgelegt.

4.1.3. Stickstoffmonoxidmessungen mit FNOCT

Wenn frische Schweineaortensegmente mit Pyren-FNOCT (50 μM) und N^G -Monomethyl-L-Arginin (0,1 mM) oder dem Substrat L-Arginin (0,5 mM) oder L-Arginin (0,5 mM) und Ionomycin (10 μM) inkubiert wurden, zeigte sich ein geringer, aber messbarer Unterschied in der Fluoreszenz zwischen den NMA-Ansätzen und den L-Arg und L-Arg + Ionomycin-Ansätzen (Originalregistrierung in Abbildung 15). Das Signal in den Ansätzen war durch NMA inhibierbar, so dass hier wirklich die Freisetzung von NO gemessen wurde. Die höheren Reagenzleerwerte in den zellfreien Kontrollen (Abbildung 15, Legende) erklären sich dadurch, dass Zellen Pyren-FNOCT, wie andere FNOCTs auch unspezifisch akkumulierten (Hornig, F. S. et al., 2006) und so zu einer geringeren Pyren-FNOCT-Konzentration im Überstand als in den zellfreien Kontrollen führen (in Zellkultur ca. 30%, Rauen, U. et al. 2006, unveröffentlichte Ergebnisse), so dass hier die NMA-Ansätze als Bezugsgröße für den Background verwendet wurden.

Die zellfreie Kalibrierung mit definierten Mengen des NO-Donators MAHMA-NO, das aus einem Molekül MAHMA-NO zwei Moleküle NO freisetzt (Keefer, L. K. et al., 1996), zeigte, dass vergleichsweise geringe NO-Konzentrationen mit dem neuen Farbstoff nachgewiesen werden konnten und Pyren-FNOCT so ein sensitiver Nachweis für NO ist (Abbildung 15, Inset).

In den L-Arginin-haltigen Versuchen ohne Ionomycin wurden $0,35 \pm 0,27$ μM NO und in Gegenwart von Ionomycin $0,34 \pm 0,11$ μM NO produziert, so dass

2,2 cm² Endothelzellfläche von den L-Arginin + Ionomycin behandelten Aortensegmenten $0,14 \pm 0,04$ nmol und von den in L-Arginin inkubierten Segmenten $0,14 \pm 0,11$ nmol NO freisetzen (Tabelle 6).

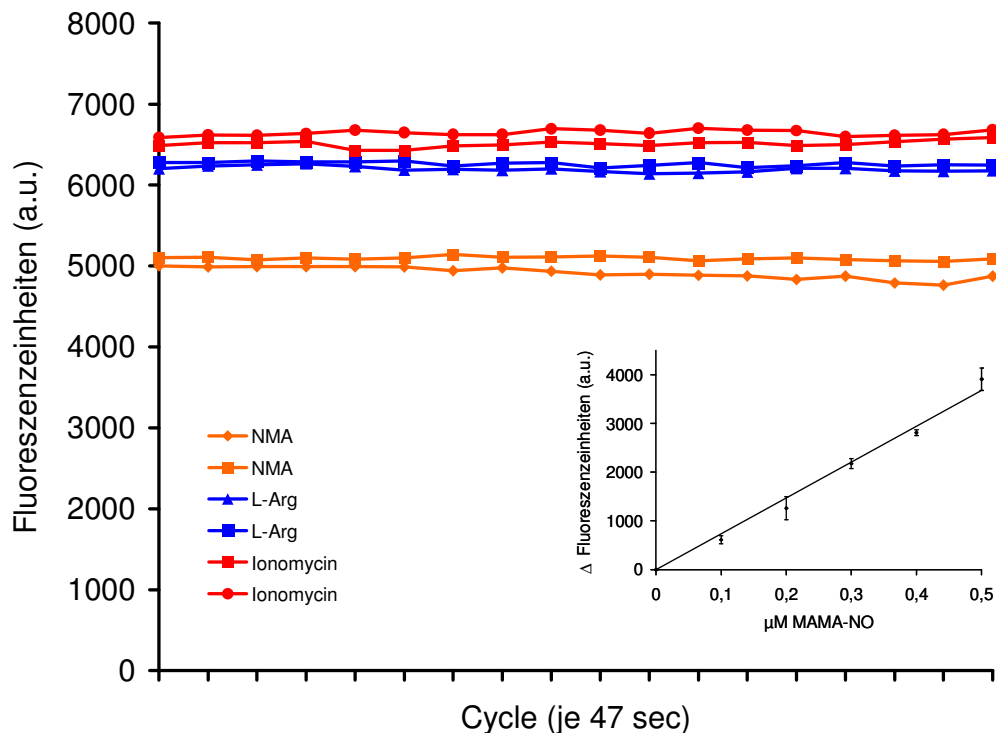


Abbildung 15. Exemplarische Originalbestimmung im Aortenmodell.

Frische Schweineaortensegmente wurden 30 Minuten in HBSS + 10 mM Glukose mit oder ohne 0,1 mM N^G-Monomethyl-L-Arginin vorinkubiert, anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit Pyren-FNOCT (50 μM), Trolox (100 μM), DTPA (100 μM), Pluronic (0,02%) und 0,1 mM N^G-Monomethyl-L-Arginin (NMA) bzw. 0,5 mM L-Arginin (L-Arg) bzw. 0,5 mM L-Arginin + 10 μM Ionomycin (L-Arg + Ionomycin). Mit einem Mikroplattenreader wurde bei 37°C die Fluoreszenz des Überstandes bei $\lambda_{exc.} = 340 \pm 10$ nm, $\lambda_{em.} = 400$ nm und definierter Detektorempfindlichkeit über 14 Minuten im Doppelansatz gemessen. Die Reagenzleerwerte wurden ebenfalls gemessen und betragen für diesen Versuch im NMA-Ansatz 10020 ± 817 , für den L-Arg-Ansatz 10746 ± 1001 und für den Ionomycin-Ansatz 11350 ± 761 Fluoreszenzeinheiten. Das Inset zeigt die Kalibrierungsgerade im zellfreien System mit 50 μM Pyren-FNOCT, Trolox (100 μM), DTPA (100 μM) und Pluronic (0,02%) bei 37°C, die mit identischen Detektoreinstellungen gemessen wurde und anhand derer die ΔFluoreszenzeinheiten in NO-Freisetzung umgerechnet wurden (Reagenzleerwert hierbei abgezogen).

Am ungelagerten Endothel von Aorten stand ein kleines Signal bereits einem hohen Background gegenüber (Abbildung 15). Da nach Kaltlagerung voraussichtlich weniger NO freigesetzt wird und es gleichzeitig durch

unterschiedliche Vorschädigung des Endothels zu einer inkonstanten Akkumulation des Farbstoffs in den Endothelzellen kommt, ist diese Methode nach Kaltlagerung deshalb nicht einsetzbar.

Tabelle 6. Messung der Fluoreszenz und Umrechnung in freigesetztes NO.

	Fluoreszenz- einheiten (a.u.)	ΔFluores- zenz (a.u.)	NO-Freisetzung (Konzentration)	NO-Freisetzung (Menge)
NMA	4970 ± 2577	-	-	-
L-Arg	6249 ± 2906	1278 ± 979	0,35 ± 0,27 μM	0,14 ± 0,11 nmol
L-Arg + Ionomycin	6398 ± 2469	1268 ± 414	0,34 ± 0,11 μM	0,14 ± 0,04 nmol

Durch die Messung der Fluoreszenz und das Definieren der N^G-Monomethyl-L-Arginin-Ansätze (NMA) als Negativkontrollen konnte ΔFluoreszenz unter Berücksichtigung der zellfreien Kontrollen und damit der Effekt von L-Arg- und L-Arg + Ionomycin für jeden Einzelversuch gemessen werden. Anhand der Eichkurve konnte dann die NO-Freisetzung berechnet werden. Die freigesetzte NO-Menge bezieht sich auf 400 μl Versuchsreagenz auf 2,2 cm² Endothelzellfläche. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwert ± SD von 9 Aortensegmenten.

4.1.4. Thrombozytenadhäsion

Die beste Beurteilung der Thrombozytenadhäsion war nach einer Beladung der Thrombozyten mit 2 μM SNARF-1 für 60 Minuten und anschließender 30-minütiger Inkubation der Thrombozytensuspension auf dem kaltgelagerten und wiedererwärmten Endothel von Schweineaortensegmenten möglich und wurde daher für die in 4.10. dargestellten Messungen verwendet. Anfänglich wurden humane und porcine Thrombozyten parallel getestet. Da die Ergebnisse jedoch identisch waren, wurde dann auf Grund der besseren Verfügbarkeit humanen Thrombozyten der Vorzug gegeben. Die Zahl der anhaftenden Thrombozyten an frischen Aortensegmenten lag zwischen 9 - 22 Thrombozyten pro Gesichtsfeld. Wurden Aortensegmente mit dem Skalpell abgeschabt, war nur noch ein großes Thrombozytenkonglomerat zu erkennen (Positivkontrolle).

4.2. Auftreten einer kälteinduzierten Schädigung an Endothelzellen von Schweineaortensegmenten

Nachdem die Methoden etabliert waren, wurde mit der systematischen Kaltlagerung von Schweineaortensegmenten begonnen. Wurden Aortensegmente für 2 - 14 Tage in HTK-Lösung gelagert, kam es mit zunehmender Zeit der Kaltlagerung zu einer Zunahme der Endothelzellschädigung (Propidiumjodidaufnahme) von $1 \pm 1\%$ nach 2 Tagen auf $28 \pm 17\%$ nach 14 Tagen (Abbildung 16).

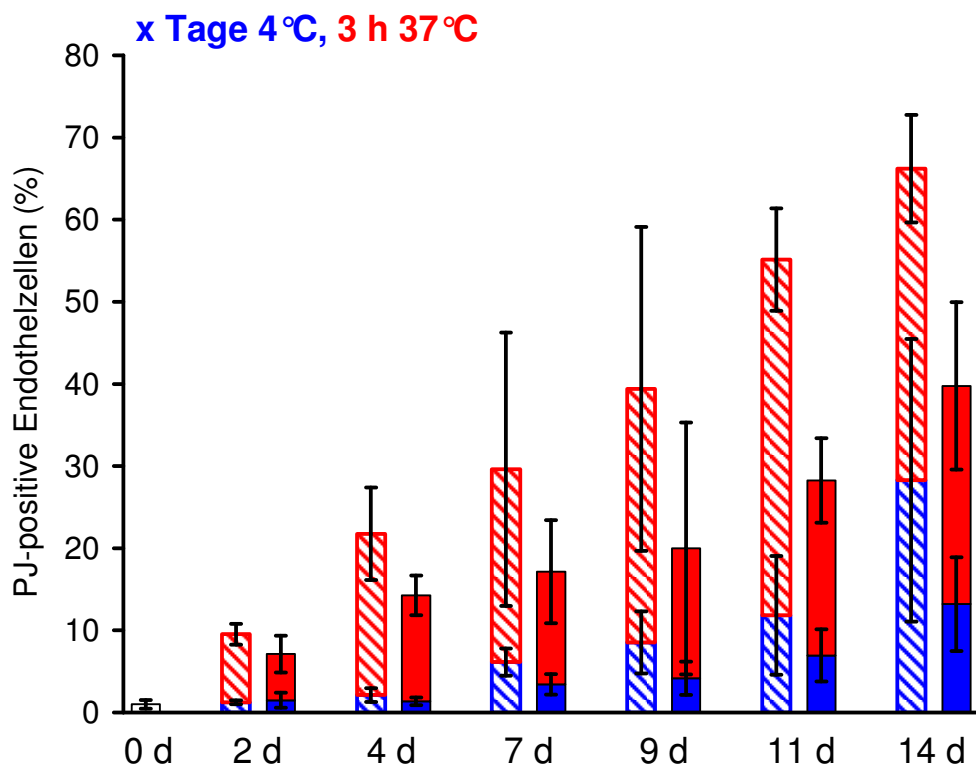


Abbildung 16. Auftreten kälteinduzierter Schädigung im Endothel von Schweineaorten.

Schweineaortensegmente wurden für 2 - 14 Tage (d) bei 4°C in HTK-Lösung (schraffierte Balken) oder in HTK-Lösung supplementiert mit 1 mM Desferal (gefüllte Balken) gelagert und danach unmittelbar mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt (blaue Balken) oder in HBSS + Glukose (10 mM) für 3 Stunden wiedererwärmt und dann mit Propidiumjodid gefärbt (rote Balken). Gefäßsegmente 0 d (Kontrolle) wurden nicht kaltgelagert, aber analog zum Wiedererwärmungsprozedere für 3 Stunden bei 37°C in HBSS + 10 mM Glukose gelagert. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwert \pm SD von 5 Aortensegmenten, in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

Die kälteinduzierte Schädigung dieses Endothels *in situ* war klar von der Dauer der Kaltlagerungszeit abhängig und stieg von 2 bis auf 14 Tage an. Während nachfolgender dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose, stieg diese Schädigung auf $66 \pm 7\%$ (schraffierter, roter Balken) an.

4.3. Partiiell eisenabhängige Kälteschädigung an Endothelzellen von Schweineaortensegmenten

Wenn Schweineaortensegmente für 14 Tage bei 4°C in HTK-Lösung + 1 mM Desferal gelagert wurden, sank der prozentuale Anteil toter Endothelzellen im Vergleich zur Desferal-freien HTK-Lösung deutlich, sowohl nach isolierter Kaltlagerung (blaue Balken) als auch nach anschließender dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose (rote Balken, Abbildung 17).

4.4. Unabhängigkeit des Eisenchelatorschutzeffektes von der eingesetzten Konservierungslösung im *in situ*-Endothel

Wenn HTK, HBSS + 10 mM Glukose oder modifizierte HTK-Lösungen (Lösungen 1 - 4, nähere Erläuterungen im nächsten Kapitel; Lösungszusammensetzung siehe Tabelle 3, herausnehmbares Exemplar auf letzter Seite) als Konservierungslösungen benutzt wurden, führte die Zugabe eines Eisenchelators in kaltgelagerten Aortensegmenten in allen Konservierungslösungen zu einem ähnlichen protektiven Effekt, so dass der Schutzeffekt durch Eisenchelatoren unabhängig von der eingesetzten Konservierungslösung ist (auch wenn die Art der Konservierungslösung das Ausmaß der Schädigung ebenfalls beeinflusst; Abbildung 17).

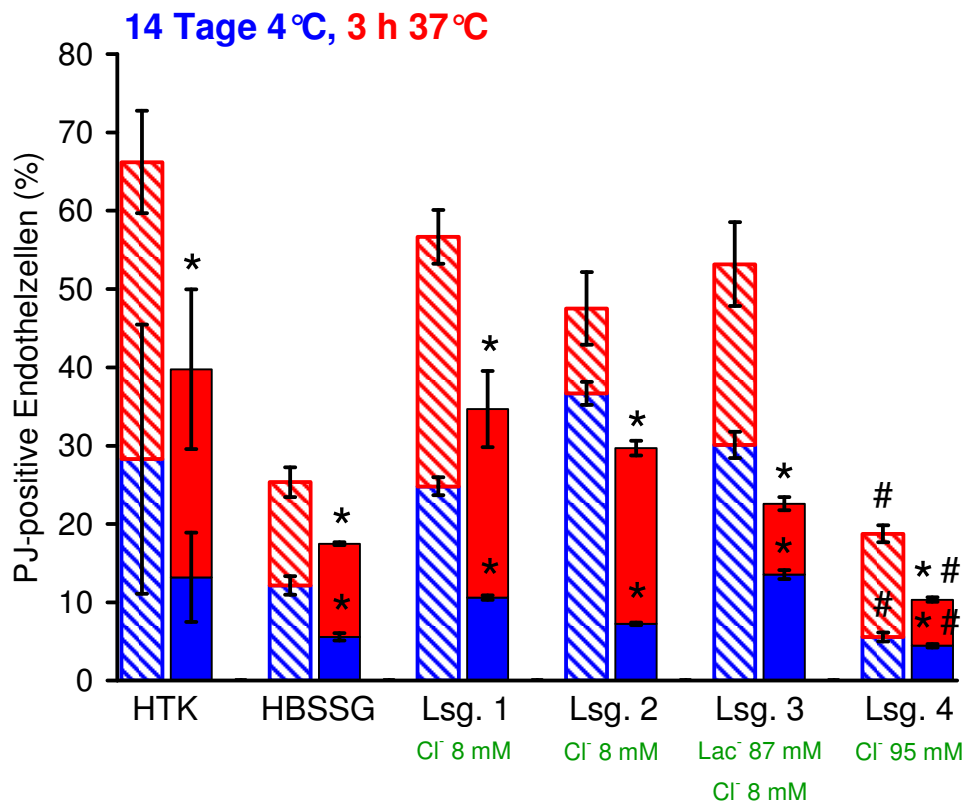


Abbildung 17. Eisenchelator Desferal hemmt partiell die Endothelzellschädigung in Schweineaortensegmenten nach Kaltlagerung in verschiedenen Lösungen.

Schweineaortensegmente wurden für 14 Tage bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) Lösung, HBSS + 10 mM Glukose (HBSSG) und den Lösungen 1 (ionenarm), 2 (ionenarm/MOPS), 3 (Na⁺/Lactobionat (Lac⁻)-reich) und 4 (Na⁺/Cl⁻-reich) (siehe Tabelle 3, herausnehmbares Exemplar auf letzter Seite) jeweils mit (volle Balken) oder ohne (schraffierte Balken) den Eisenchelator Desferal (1 mM) gelagert und danach unmittelbar mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt (blaue Balken) oder in HBSS + Glukose (10 mM) wiedererwärmt und dann mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt (rote Balken). Zur Erleichterung der Interpretation sind die Cl⁻- und Lactobionat- (Lac⁻) Konzentrationen der Lösungen 1 - 4 in grün unter den Lösungsnamen vermerkt. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung ohne Eisenchelator, $p < 0,05$.

signifikant unterschiedlich zur chloridarmen Kontrolle (Lösung 3), $p < 0,05$.

4.5. Optimierung der Basislösung

Kürzlich wurde eine modifizierte HTK-Lösung für die experimentelle Organkonservierung eingeführt (Rauen, U. et al., 2008), welche die Konservierungsschädigung der Leber deutlich verminderte (Stegemann, J. et al., 2009). Hier wurde daher versucht mit einer ähnlich modifizierten Lösung, die an

die Anforderung kleinerer Gewebestücke (im Gegensatz zu der Konservierung ganzer Organe) angepasst wurde, die Lagerung von Gefäßen zu verbessern. Bei dieser modifizierten Lösung wurde die für die Konservierung kleinerer Gewebestücke unnötig hohe Pufferkapazität gesenkt. Anschließend wurde die Lösung optimiert hinsichtlich:

- Anionenkonzentration (Chlorid, Lactobionat)
- Kationenkonzentration (Natrium, Kalium)
- Eisenchelatorkonzentrationen

4.5.1. Einfluss und Optimierung der Anionenzusammensetzung

Wurde Saccharose durch Natriumlactobionat (Lösung 3) ersetzt, war das Endothelzellüberleben in den Gefäßsegmentversuchen ohne Eisenchelatoren fast identisch zur respektiven saccharosehaltigen Lösung 2. Es schien jedoch, dass Lösung 3 in Gegenwart von Desferal eine etwas geringere Schädigung während der Wiedererwärmung hervorruft (Abbildung 17). Wurde in Lösung 4 die Saccharose durch Natriumchlorid ersetzt, war das Überleben von Endothelzellen in Schweineaortensegmenten, überraschenderweise sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart eines Eisenchelators (Abbildung 17) stark verbessert. Dies deutete darauf hin, dass hohe Chloridkonzentrationen bei der Gefäßlagerung im Gegensatz zur Lagerung kultivierter Hepatozyten (Rauen, U. et al., 2007) einen protektiven Effekt zeigen.

Einschub:

Versuche mit isolierten Zellen

Auf Grund der stark divergierenden Ergebnisse zum Hepatozyten (Rauen, U. et al., 2007), wurden hier zusätzlich Versuche mit isolierten Leberendothel- und Schweineaortenendothelzellen durchgeführt, um klar zwischen modell- und zelltypspezifischen Effekten des Chlorids unterscheiden zu können. Wenn isolierte Schweineaortenendothelzellen und Leberendothelzellen für 14 Tage bei 4°C in

den modifizierten Konservierungslösungen 3 und 4, jeweils mit 1 mM Desferal gelagert und anschließend 3 Stunden in Zellkulturmedium bei 37°C wiedererwärmt wurden, sank der prozentuale Anteil toter Zellen analog zu den Versuchen im intakten Gefäß, in beiden Zelllinien, wenn die Lösung chloridreich war (Abbildung 18).

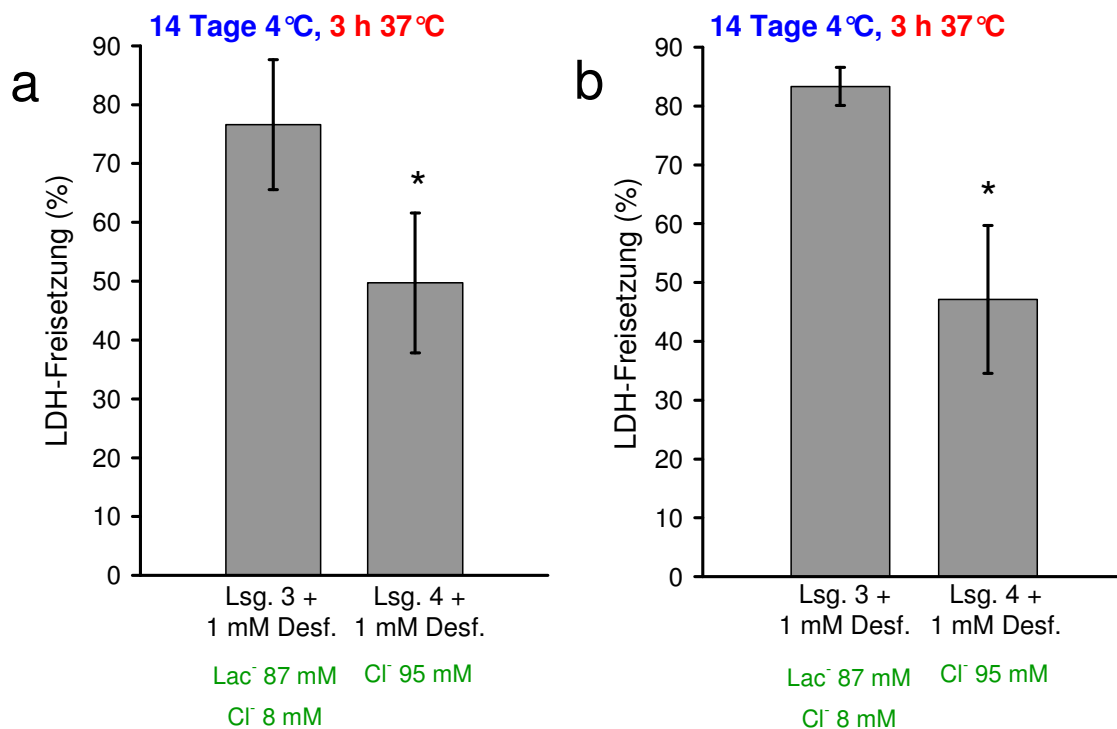


Abbildung 18. Hemmung der kälteinduzierten Schädigung von isolierten Schweineaortenendothelzellen und Leberendothelzellen durch unterschiedliche Basislösungen.

Isolierte Schweineaortenendothelzellen (a) und Leberendothelzellen (b) wurden in den modifizierten Konservierungslösungen 3 (Na⁺/Lactobionat (Lac⁻)-reich) und 4 (Na⁺/Cl⁻-reich) (Tabelle 1), jeweils mit 1 mM Desferal für 14 Tage bei 4°C gelagert und anschließend 3 Stunden bei 37°C in Zellkulturmedium wiedererwärmt. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte ± SD aus 4 unabhängigen Isolationen/Experimenten.

* signifikant unterschiedlich zur Lagerung in der Natriumlactobionat-basierten Lösung (Lösung 3), $p < 0,05$.

Zusätzliche morphologische Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass eine hohe Chloridkonzentration einen protektiven Effekt hat (Abbildung 19), so dass sich Endothelzellen offensichtlich bezüglich der Rolle von Chlorid bei der Kaltlagerung generell anders verhalten, als dies für kultivierte Hepatozyten beschrieben wurde (Rauen, U. et al., 2007).

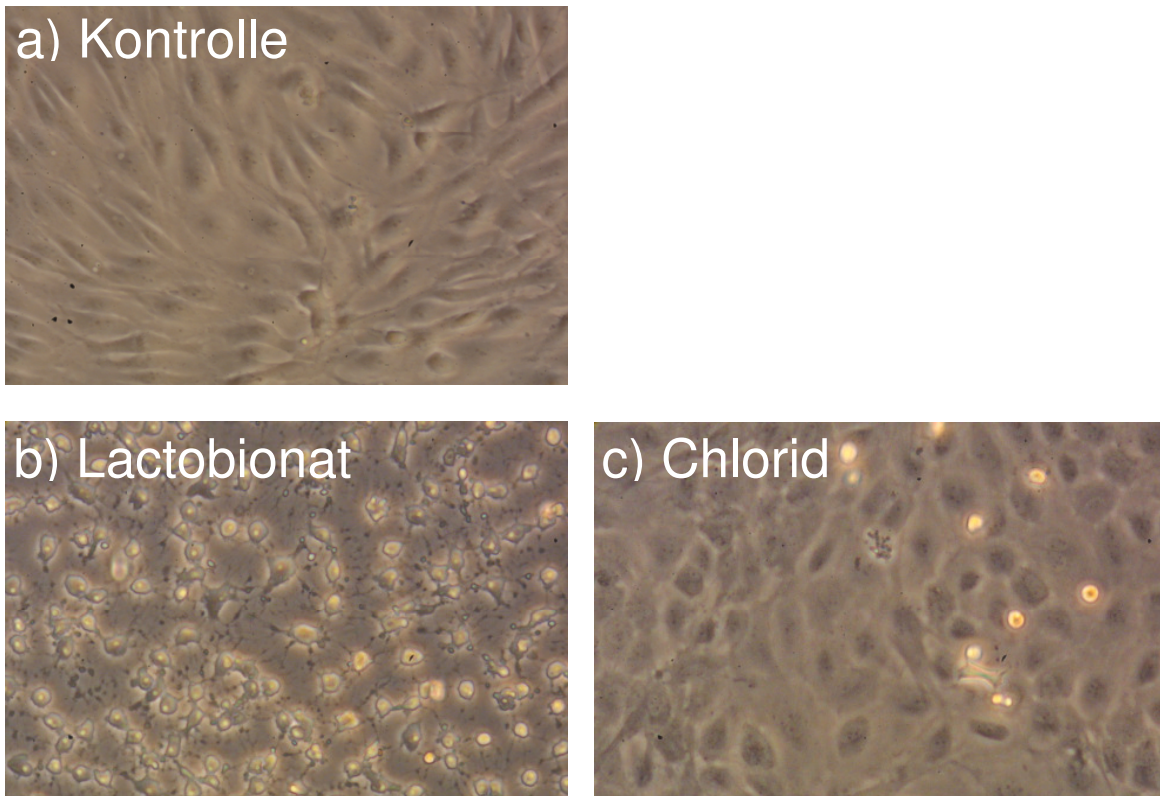


Abbildung 19. Morphologische Veränderungen primärkultivierter Schweineaortenendothelzellen nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung.

Schweineaortenendothelzellen (Kontrolle, a) wurden drei Tage bei 4°C in den modifizierten Lösungen 3 (Na⁺/Lactobionat-reich, b) und 4 (Na⁺/Cl⁻-reich, c) jeweils + 1 mM Desferal gelagert und dann für 3 Stunden in Zellkulturmedium bei 37°C wiedererwärmt. Die morphologischen Veränderungen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 200-facher Vergrößerung beurteilt. Deutlich zu sehen sind die nach der Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung auftretenden Endothelablösungen und Verlust der Zell-Zellverbindungen nach Kaltlagerung in Lösung 3 + 1 mM Desferal (b). Nach Kaltlagerung in der natriumchloridreichen Lösung 4 mit 1 mM Desferal (c) war nach der Wiedererwärmung ein intakter Monolayer erhalten. Die gezeigten Ausschnitte sind jeweils repräsentativ.

4.5.2. Optimierung des Kations

Da in isolierten Schweineaortensegmenten durch eine chlorid- und eisenchelatorhaltige Lösung der Anteil der toten Endothelzellen auf 10% gesenkt werden konnte, wurde, um weitere Optimierungen durchführen zu können, die Kaltlagerung auf 21 Tage verlängert und in der Konservierungslösung die hohe Konzentration des Kations Natrium (Lösung 6) durch Kalium (Lösung 7) ersetzt. Dadurch konnte die Endothelzellschädigung in Anwesenheit des Eisenchelators Desferal (1 mM) weiter signifikant vermindert werden (Abbildung 20).

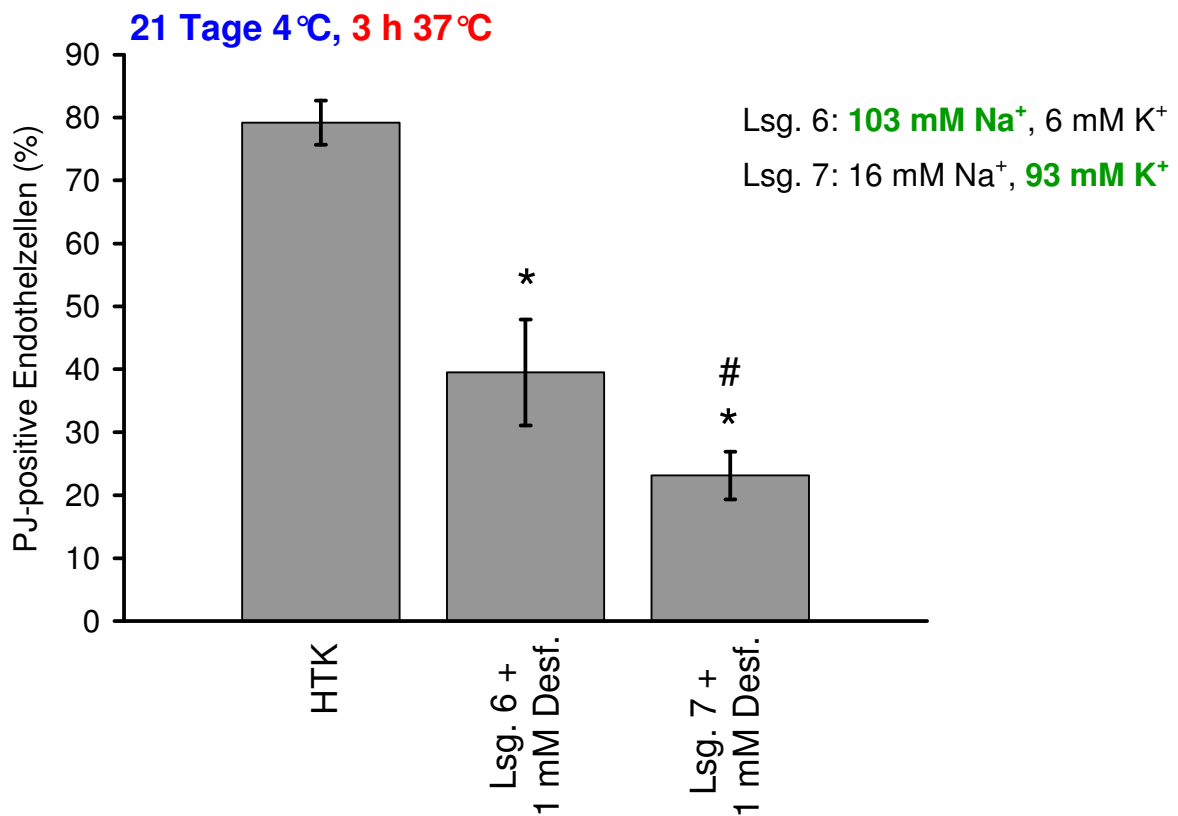


Abbildung 20. Optimierung des Endothelzellüberlebens durch den Einsatz hoher extrazellulärer Kaliumkonzentrationen.

Schweineaortensegmente wurden für 21 Tage bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung, Lösung 6 (Na⁺-reich) und 7 (K⁺-reich) supplementiert mit dem Eisenchelator Desferal (Desf.) gelagert. Alle Segmente wurden bei 37°C in HBSS + 10 mM Glukose für drei Stunden wiedererwärmt und dann mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Zur Erleichterung der Interpretation sind die Natrium- und Kalium-Konzentrationen in der Abbildung angegeben. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in Lösung 6 + 1 mM Desferal, $p < 0,05$.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in HTK-Lösung, $p < 0,05$.

4.5.3. Überprüfung von Puffersystem und Aminosäurekonzentrationen

Wenn Schweineaortensegmente für 14 Tage bei 4°C in einer ionenarmen (also auch chloridarmen), saccharosereichen *N*-Acetylhistidin-gepufferten Lösung (Lösung 1) mit oder ohne Desferal gelagert wurden, war der Anteil toter Endothelzellen nur geringfügig kleiner, als bei Lagerung in HTK-Lösung (Abbildung 17), jedoch konnten während der Wiedererwärmung einige frei

schwimmende Zellen beobachtet werden, was auf das Ablösen des Endothels von der subendothelialen Matrix hinweist. Lösung 2, mit MOPS als Puffersystem, zeigte bezüglich Endothelzellüberleben sowohl in der Gegenwart als auch in Abwesenheit von Desferal, ähnliche Ergebnisse wie die *N*-Acetylhistidin-gepufferte respektive Kontrolle Lösung 1 (Abbildung 17). Auch die weiter optimierte Konservierungslösung 5 zeigte wie die respektive Kontrolle (Lösung 4) nach Verlängerung der Kaltlagerungszeit auf 21 Tage und Wiedererwärmung einen ähnlichen Anteil toter Endothelzellen ($30 \pm 7\%$ vs. $29 \pm 6\%$). Daraus lässt sich schließen, dass der Einsatz von *N*-Acetylhistidin oder MOPS als Puffer hinsichtlich Vitalität keinen Unterschied ausmacht. Wurden parallel zu den Modifikationen im Optimierungsprozess der Organkonservierungslösung die Konzentrationen der Aminosäuren Glycin und Alanin vermindert (Lösung 6; $24 \pm 4\%$ tote Endothelzellen), führte dies ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung des Anteils toter Endothelzellen in Schweineaortensegmenten.

4.6. Optimierung des Eisenchelatorzusatzes

In der soweit am besten optimierten Basislösung (Lösung 7) wurden nun die Eisenchelatoren und deren Konzentrationen variiert. Es wurde der bekannte und in der Klinik etablierte, hydrophile Eisenchelator Desferal eingesetzt. Desferal ist ein starker sechszähliger Ligand mit drei Hydroxamsäuregruppen ($\text{R-C}(\text{-NH-OH})=\text{O}$), der allerdings nur schwach membrangängig ist. Deshalb wurde zusätzlich das neu synthetisierte Hydroxamsäurederivat LK 614 eingesetzt (Abbildung 3). Dieser Chelator besitzt lediglich eine Hydroxamsäuregruppe und wurde auf Grund seiner Lipophilie eingesetzt, in der Annahme, dass LK 614 leichter Zellmembranen permeiert und so intrazelluläres „redox-aktives“ Eisen insbesondere in der frühen Phase der Kaltlagerung chelatisiert. Der Zusatz von 50 μM oder 20 μM LK 614 führte zu einer signifikant besseren Protektion als 1 mM Desferal alleine (Abbildung 21). Die Kombination aus 20 μM LK 614 und den bisher eingesetzten 1 mM Desferal zeigte einen geringeren Schutzeffekt als der isolierte Einsatz von 20 μM LK 614, was auf eine mögliche Toxizität hinweist. Die Desferalkonzentration wurde daraufhin gesenkt und eine optimale Protektion wurde mit 20 μM LK 614 und 0,1 mM Desferal bei lediglich $10 \pm 1\%$ toten

Endothelzellen nach 21 Tagen Kaltlagerung und anschließender Wiedererwärmung erreicht (Abbildung 21).

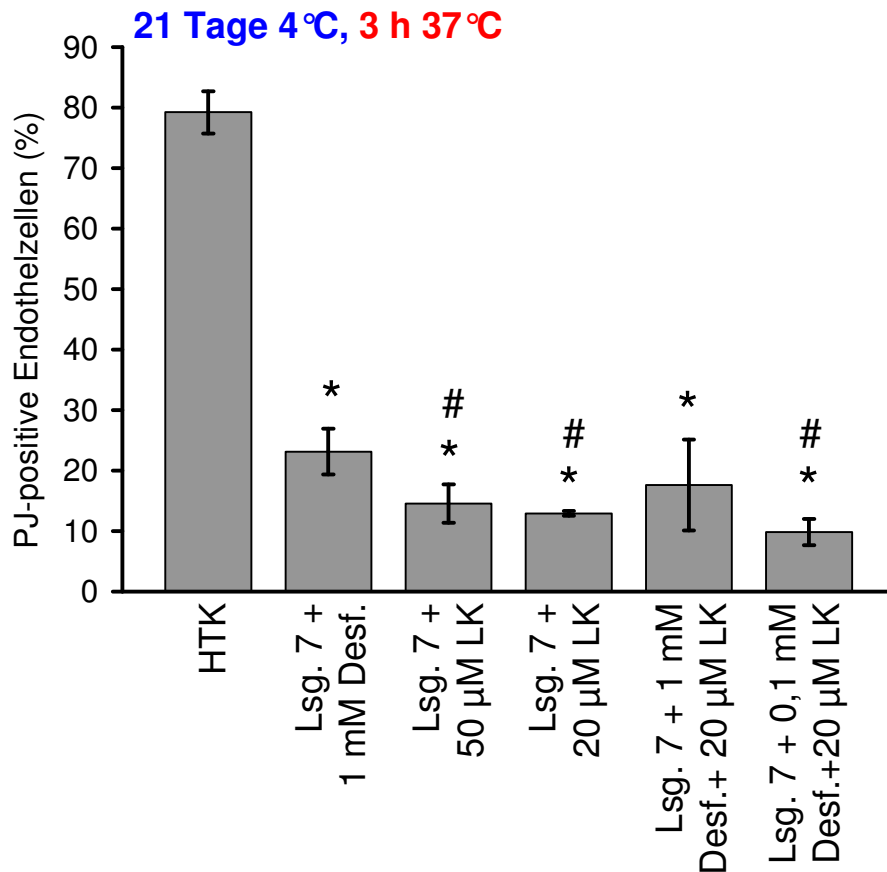


Abbildung 21. Optimierung der Eisenchelatorkonzentrationen.

Schweineaortensegmente wurden für 21 Tage bei 4°C in HTK-Lösung und Lösung 7 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Desferal (Desf.) und/oder LK 614 (LK), einem neuen lipophilen Hydroxamsäurederivat, gelagert. Alle Segmente wurden bei 37°C in HBSS + 10 mM Glukose für drei Stunden wiedererwärmt und dann mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte \pm SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in Lösung 7 + 1 mM Desferal, $p < 0,05$.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in HTK Lösung, $p < 0,05$.

4.7. Weitere Testung der Basislösung mit optimierter Chelatorkonzentration

Die bis dahin beste Basislösung (Lösung 7), mit optimierter Chelatorkonzentration (0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614) wurde nun nochmal gegen eine aktualisierte Lösung mit leicht veränderten Aminosäurekonzentrationen (Lösung 8, die Modifizierung wurde wieder durch die Änderung in der Organkonservierungslösung ausgelöst) getestet (Abbildung 22).

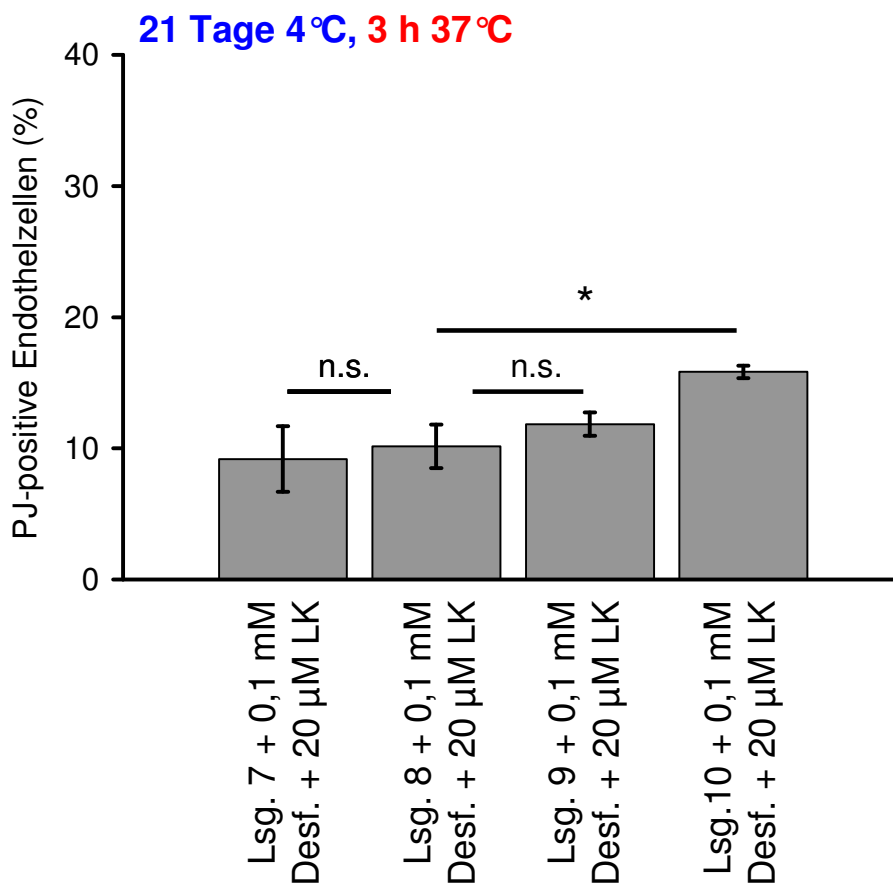


Abbildung 22. Vergleich zwischen den neuen modifizierten Lösungen.

Schweineaortensegmente wurden für 21 Tage bei 4°C in den neuen Lösungen 7 (K⁺-reich, geringere Aminosäurekonz.), 8 (K⁺-reich), 9 (Na⁺-reich) and 10 (K⁺-reich, pH 7,4) mit optimierten Eisenchelatorkonzentrationen (0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614; 0,1 mM Desf. + 20 µM LK) gelagert und nach anschließender dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose und Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

* signifikant unterschiedlich zur respektiven Lösung mit pH 7,4 (Lösung 10), $p < 0,05$.

Die aktualisierte Lösung 8 wurde sicherheitshalber nochmal gegen eine natriumchloridhaltige Variante dieser Lösung (Lösung 9) getestet, wobei Lösung 7 (ursprünglich optimierte Gefäßlösung), 8 (aktualisierte Lösung) und 9 (Na⁺-reiche Lösung) mit optimierten Chelatorkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Endothelzellüberlebens nach 21 Tagen Kaltlagerung und dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose (37°C) zeigten (Abbildung 22). Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 7,4 (Lösung 10) hingegen resultierte in vermindertem Endothelzellüberleben, verglichen mit Lösung 8 als respektive Kontrolle. Lösung 8 + 0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614 war damit die Lösung der Wahl, die nun weiter gegen klinisch eingesetzte Lösungen zur Gefäßlagerung und hinsichtlich anderer Parameter getestet wurde.

4.8. Vergleich der besten Lösung mit den momentan klinisch eingesetzten Lösungen bezüglich Endothelzellvitalität im intakten Gefäß

Verglichen mit den Lösungen, die momentan in der Klinik eingesetzt werden, wie HTK-Lösung, physiologische Kochsalzlösung, Perfadex- und UW-Lösung, zeigte Lösung 8 mit optimiertem Eisenchelatorzusatz (0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614) ein weitaus besseres Überleben der Gefäßendothelzellen (Abbildung 23). Im selben Modell wurden die Puffereigenschaften der modifizierten und klinisch etablierten Lösungen untersucht. Vor und nach 21 Tagen Lagerung in den Konservierungslösungen 8, 9, 10 jeweils mit 0,1 mM Desferal und 20 µM LK 614 (0,1 mM Desf. + 20 µM LK), UW-, Perfadex-, NaCl 0,9%- und HTK-Lösung, wurde bei 4°C der pH-Wert der Lösungen gemessen. Die *N*-Acetylhistidin- (*N*-Ac-His), Histidin- und Phosphat (HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻)-gepufferten Lösungen hielten den pH-Wert über 3 Wochen Lagerung im Vergleich zum Ausgangswert relativ konstant (Tabelle 7). Bei der TRIS-gepufferten Perfadex hingegen sank der pH-Wert von 7,40 auf 6,39 ± 0,11; bei der ungepufferten physiologischen Kochsalzlösung von pH 6,32 auf 6,09 ± 0,04.

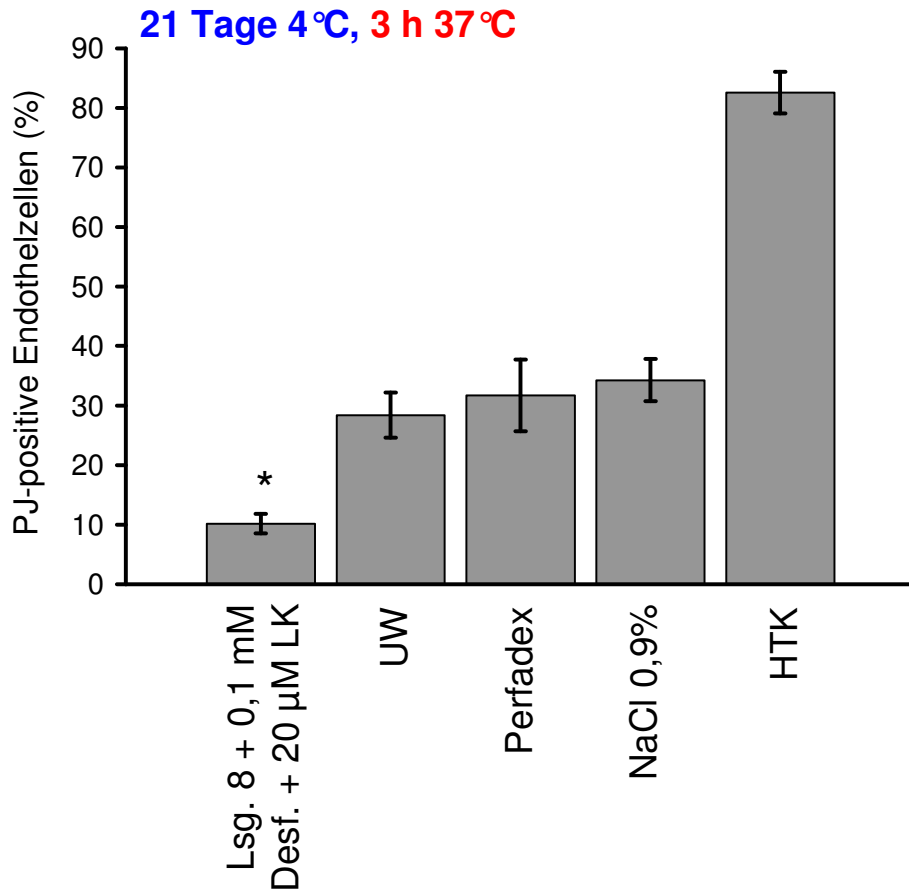


Abbildung 23. Vergleich zwischen der neuen Lösung und derzeit in der Klinik eingesetzten Lösungen.

Schweineaortensegmente wurden für 21 Tage bei 4°C in der neuen Lösung 8 mit optimierten Eisenchelatorkonzentrationen (0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614; 0,1 mM Desf. + 20 µM LK), UW-, Perfadex-Lösung, physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) und HTK-Lösung gelagert und nach anschließender dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

* signifikant unterschiedlich zu allen vier anderen Lösungen, $p < 0,05$.

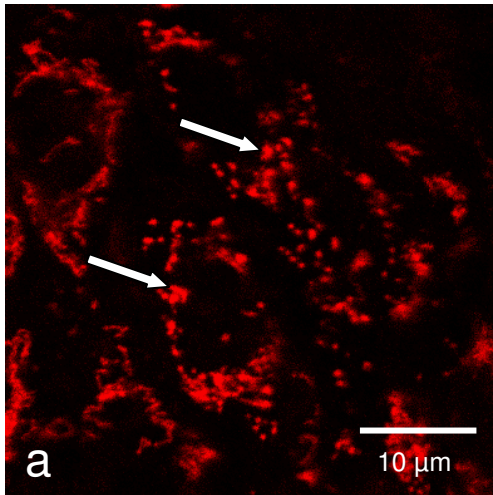
Tabelle 7. pH-Werte der eingesetzten Lösungen.

Lösung	pH Beginn	pH 21 Tage	Puffer- system	Konzentration (mM)
Lsg. 8 + 0,1 mM Desf. + 20 µM LK	7,03	6,97 ± 0,01	<i>N</i> -Ac-His	30
Lsg. 9 + 0,1 mM Desf. + 20 µM LK	7,04	6,96 ± 0,02	<i>N</i> -Ac-His	30
Lsg.10 + 0,1 mM Desf. + 20 µM LK	7,44	7,39 ± 0,02	<i>N</i> -Ac-His	30
UW	7,43	7,36 ± 0,05	HPO ₄ ²⁻ / H ₂ PO ₄ ⁻	25
Perfadex	7,40	6,39 ± 0,11	TRIS	1
NaCl 0,9%	6,32	6,09 ± 0,04	-	-
HTK	7,36	7,33 ± 0,01	Histidin	198

Schweineaortensegmente wurden 21 Tage in klinisch etablierten oder modifizierten Konservierungslösungen kaltgelagert. Die pH-Werte der Lösungen wurden bei 4°C vor der Lagerung und unmittelbar nach der Kaltlagerung von Aortensegmenten gemessen, um die pH-Wert-Stabilität der Lösungen mit ihren Puffersystemen *N*-Acetylhistidin (*N*-Ac-His), Phosphat (HPO₄²⁻/ H₂PO₄⁻), TRIS und Histidin zu bestimmen. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von je 4 pH-Wert-Messungen von 25 ml Konservierungslösung.

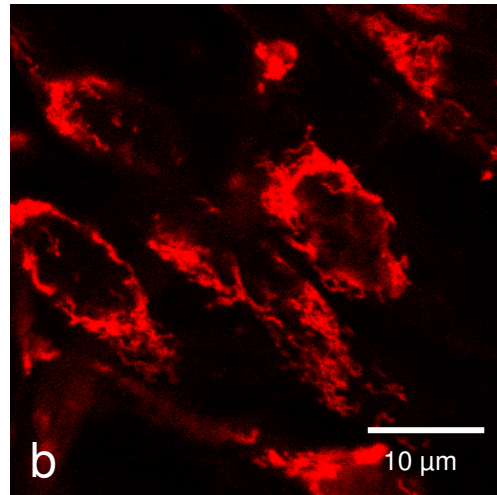
4.9. Mitochondriales Membranpotential

Wie in der Einleitung dargestellt, sind Mitochondrien ein kritisches Target der kälteinduzierten Schädigung. Daher wurde das mitochondriale Membranpotential der Endothelzellen in Schweineaortensegmenten mit dem Laserscanningmikroskop nach Färbung mit TMRM nach 7 und 14 Tagen Kaltlagerung und 3 Stunden Wiedererwärmung (37°C) in HBSS + 10 mM Glukose untersucht. Wenn Gefäßsegmente 7 Tage bei 4°C in Lösung 8 ohne Chelatoren gelagert wurden, zeigten diese unmittelbar nach Kaltlagerung ein vermindertes Membranpotential, das sich nach 3 Stunden Wiedererwärmung wieder erholte (Abbildung 24) und qualitativ bessere Ergebnisse als die klinisch eingesetzte Lösung HTK +/- 1 mM Desferal (vgl. Abbildung 24 mit 25 a,b).



Lösung 8

7 Tage 4°C



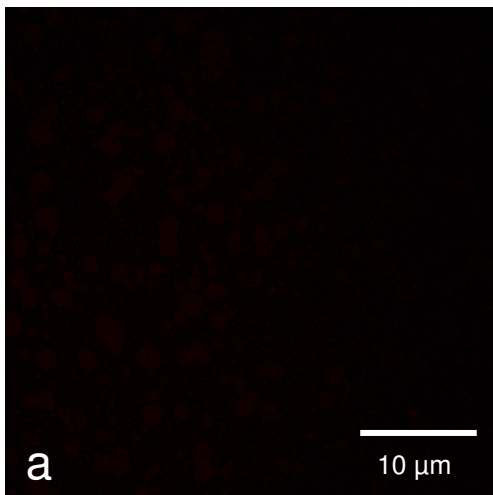
Lösung 8

7 Tage 4°C, 3 h 37°C

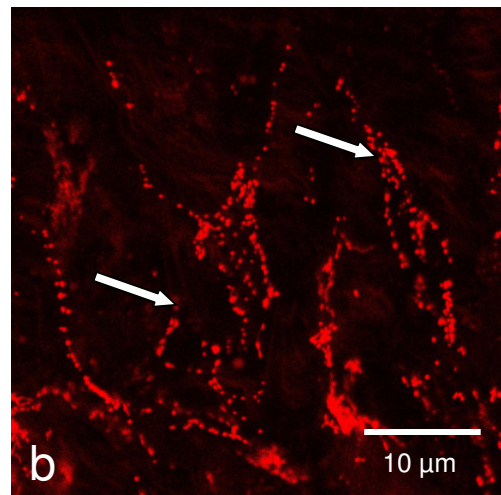
Abbildung 24. Zeitverlauf des mitochondrialen Membranpotentials von Endothelzellen in Gefäßsegmenten.

Schweineartensegmente wurden für 7 Tage in Lösung 8 (K^+ -reich) kalt gelagert und unmittelbar nach Kaltlagerung und Färbung mit TMRM mit einem Laserscanningmikroskop untersucht (a). Danach wurden die Segmente in HBSS + 10 mM Glukose 3 Stunden wiedererwärmt und das mitochondriale Membranpotential und die mitochondriale Morphologie anschließend wieder untersucht (b). Unmittelbar nach Kaltlagerung zeigte sich eine punktartige Akkumulation des TMRM (weiße Pfeile, a; eine andere Ausrichtung der Mitochondrien wurde mikroskopisch ausgeschlossen), die nach Wiederwärmung nicht mehr darzustellen war. Die Mitochondrien zeigten nach Wiedererwärmung eine Zunahme des mitochondrialen Membranpotentials. Die gezeigten Ausschnitte sind für das Präparat jeweils repräsentativ. Frische Kontrolle zum Vergleich siehe Abbildung 14 a.

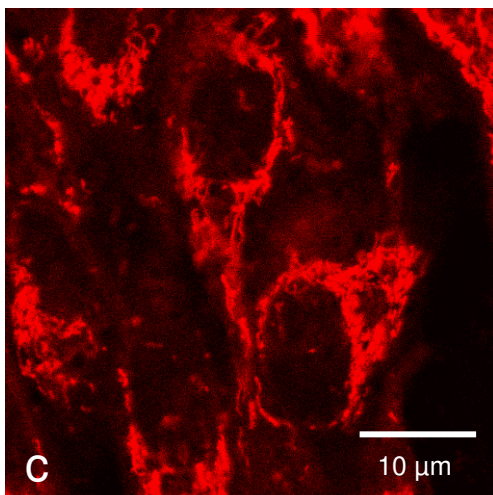
Wurden Schweineartensegmente nach 7 Tagen Lagerung in HTK-Lösung (Abbildung 25 a), Perfadex und physiologischer Kochsalzlösung untersucht, war kein mitochondriales Membranpotential der Endothelzellen mehr nachweisbar (Abbildung 26). Die Zugabe von 1 mM Desferal zur HTK-Lösung führte im Vergleich zur chelatorfreien Kontrolle zu einem besser erhaltenen mitochondrialen Membranpotential (Abbildung 25 b, 26), Lösung 8 + 0,1 mM Desferal + 20 μ M LK 614 verbesserte dies nochmal (Abbildung 25 c). In Lösung 8 mit optimierter Chelatorkonzentration gelagerte Segmente (Abbildung 25 d) wiesen selbst nach 14 Tagen noch 49% des Ausgangswertes des mitochondrialen Membranpotentials auf (Abbildung 26). Die kaliumreiche Lösung 8 erhielt das mitochondriale Membranpotential signifikant besser als die respektive natriumreiche Lösung 9 und als Lösung 10 mit pH-Wert 7,4.



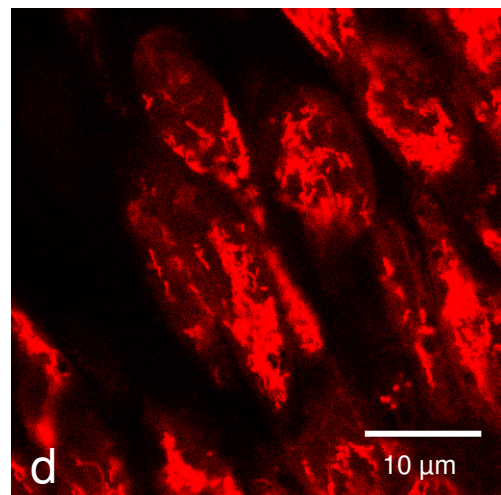
a
HTK
7 Tage 4°C, 3 h 37°C



b
HTK + 1 mM Desferal
7 Tage 4°C, 3 h 37°C



c
Lsg. 8 + opt. Chelatoren
7 Tage 4°C, 3 h 37°C



d
Lsg. 8 + opt. Chelatoren
14 Tage 4°C, 3 h 37°C

Abbildung 25. Beurteilung des mitochondrialen Membranpotentials von Schweineaortenendothelzellen in Aortensegmenten nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung.

Aortensegmente wurden bei 4°C für sieben Tage in HTK (a), HTK + 1 mM Desferal (b), Lösung 8 mit 0,1 mM Desferal + 20 μM LK 614 (c), oder für 14 Tage in Lösung 8 mit 0,1 mM Desferal + 20 μM LK 614 (d) gelagert und anschließend für drei Stunden in HBSS + 10 mM Glukose bei 37°C wiedererwärmt. Das mitochondriale Membranpotential wurde mittels Laserscanningmikroskop nach Färbung mit TMRM bestimmt. Nach der Wiedererwärmung zeigte sich in HTK + 1 mM Desferal gelagerten Segmenten (b) eine punktartige Akkumulation des TMRM (weiße Pfeile). Die gezeigten Ausschnitte sind für das Präparat jeweils repräsentativ.

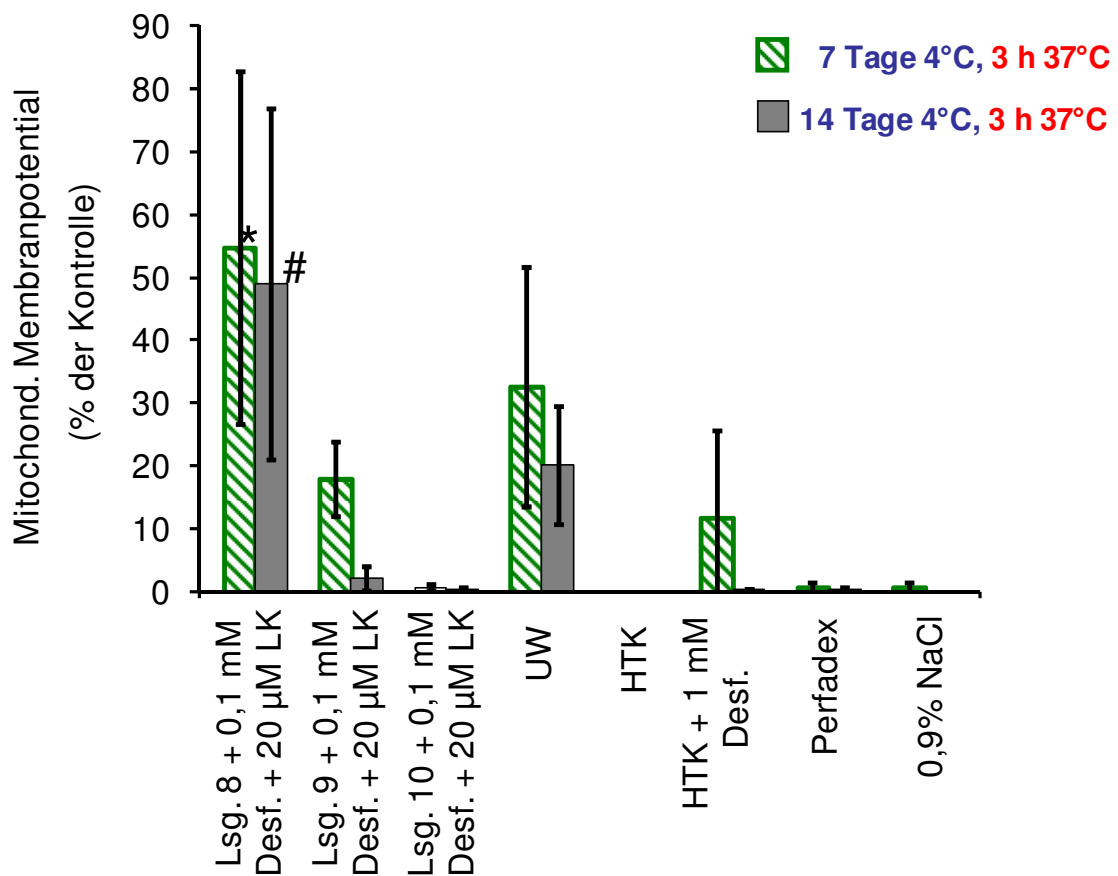


Abbildung 26. Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials der Endothelzellen von Schweineaortensegmenten nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung.

Schweineaortensegmente wurden für 7 oder 14 Tage bei 4°C in HTK-Lösung, HTK + 1 mM Desferal, physiologischer Kochsalzlösung, Perfadex-, UW-Lösung und den drei modifizierten Lösungen 8 (K⁺-reich), 9 (Na⁺-reich) und 10 (K⁺-reich, pH = 7,4; alle drei mit optimierten Eisenchelatorkonzentrationen; 0,1 mM Desf. + 20 µM LK) gelagert. Nach dreistündiger Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose wurde das mitochondriale Membranpotential nach Färbung der Aortensegmente mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM beurteilt. Das erhaltene mitochondriale Membranpotential ist als %-Wert von nicht gelagerten Kontrollsegmenten angegeben. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwerte ± SD von 4 Aortensegmenten.

* signifikant unterschiedlich gegenüber allen Lösungen außer UW, $p < 0,05$.

signifikant unterschiedlich gegenüber allen Lösungen, $p < 0,05$.

Interessanterweise zeigte sich als Nebenbefund, dass das aufgenommene TMRM unmittelbar nach Kaltlagerung nicht mehr tubulär (Abbildung 14 a), sondern punktförmig akkumulierte (Abbildung 24 a, weiße Pfeile; eine andere Ausrichtung der Mitochondrien wurde mikroskopisch ausgeschlossen). Nach der Wiedererwärmung kam es in den in Lösung 8 gelagerten Segmenten zur

Rückbildung der punktierten Strukturen (Abbildung 24 b), wohingegen in den in HTK-Lösung + 1 mM Desferal gelagerten Segmenten die punktierten Strukturen nach Wiedererwärmung weiter nachzuweisen, kleiner und zahlreicher waren als unmittelbar nach Kaltlagerung in Lösung 8 (Abbildung 25 b, weiße Pfeile).

4.10. Thrombozytenadhäsion

Wenn Schweineaortensegmente für 14 Tage bei 4°C in HTK- oder Perfadex-Lösung oder Lösung 8 + 0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614 gelagert wurden und nach 150 Minuten Wiedererwärmung in HBSS + 10 mM Glukose (37°C) 30 Minuten mit SNARF-1-gefärbten Thrombozyten in der speziell angefertigten Kammer inkubiert wurden, hefteten sich die gefärbten Thrombozyten in signifikant höherer Anzahl an Segmente, die in HTK-Lösung gelagert waren (Abbildung 27), als an Segmente, die in Perfadex oder Lösung 8 + 0,1 mM Desferal + 20 µM LK 614 gelagert waren. Die optimierte Lösung 8 war bezüglich dieses Parameters zwar tendenziell, aber nicht signifikant besser als die Perfadex-Lösung.

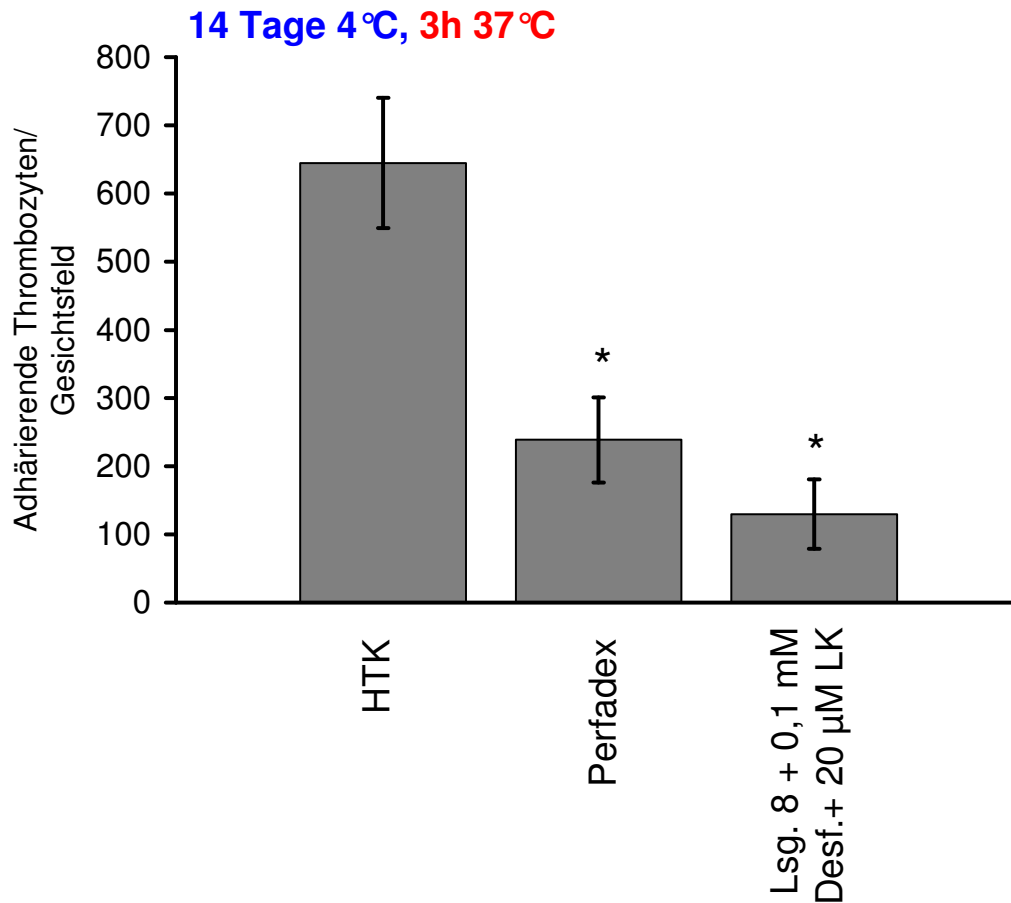


Abbildung 27. Thrombozytenadhäsion am Endothel von Schweineaortensegmenten nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung.

Schweineaortensegmente wurden für 14 Tage bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung, Perfadex und der modifizierten Lösung 8 mit optimierten Eisenchelatorkonzentrationen (0,1 mM Desf. + 20 µM LK) gelagert. Anschließend wurden die Segmente 150 Minuten in HBSS + 10 mM Glukose wiedererwärmt und dann mit den SNARF-1 gefärbten Thrombozyten für 30 Minuten in Inkubationskammern weiterinkubiert. Die gezeigten Daten verstehen sich als Mittelwert ± SD von 4 Aortensegmenten in denen jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

* signifikant unterschiedlich gegenüber HTK, $p < 0,05$.

5. Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass Endothelzellen von Schweineaortensegmenten eine kälteinduzierte, partiell eisenabhängige Schädigung erleiden. Eisenchelatoren schützen gegen diese Schädigung. Eine weitere Verbesserung der Protektion kann durch eine optimierte Basislösung erreicht werden, so dass schlussendlich die Zellschädigung des Gefäßendothels stark verringert werden kann.

Kälteinduzierte eisenabhängige Schädigung von Endothelzellen

Kultivierte Endothelzellen eignen sich gut für mechanistische Untersuchungen, dennoch stellt sich immer die Frage nach der Übertragbarkeit auf Endothel im intakten Gefäß. Da die kälteinduzierte eisenabhängige Schädigung insbesondere Endothelzellen betrifft, wurde hier ein Gefäßmodell etabliert. Im neu eingeführten Gefäßmodell wurde ein ähnlicher, eisenabhängiger, von der Lagerungszeit abhängiger (Abbildung 16) und sich bei Wiedererwärmung verstärkender Typ der Endothelzellschädigung gefunden (Abbildung 16, 17), der in allen eingesetzten Lösungen nachweisbar war (Abbildung 17).

Inzwischen konnten Zatschler et al. bei Untersuchungen zur Vasoreaktivität von Mesenterialgefäßen der Ratte nach isolierter Kaltlagerung ebenfalls einen protektiven Effekt durch die Zugabe eines Eisenchelators nachweisen (Zatschler, B. et al., 2009). Schröder et al. konnten zeigen, dass Koronargefäße der Ratte nach 8 Stunden Kardioplegie in HTK-Lösung bei 4°C durch Addition der Eisenchelatoren Desferal oder LK 616 (einem Isomer des hier eingesetzten LK 614), eine bessere endotheliale Funktion hatten als die Koronargefäße von Rattenherzen die in HTK-Lösung ohne Zusätze gelagert wurden (Schroeder, C. et al., 2007). Auf Grund der Hypoxieresistenz von Koronarendothelzellen (Buderus, S. et al., 1989; Mertens, S. et al., 1990), kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei ebenfalls überwiegend um eine Kälteschädigung handelt. Bei der Kaltlagerung des Rattendünndarms konnte durch Eisenchelatoren in einer

modifizierten HTK-Lösung im Vergleich zur eisenchelatorfreien Kontrolle eine Verbesserung der Mikrozirkulation der Darmwandkapillaren erreicht werden (Stojanovic, T. et al, unveröffentlichte Ergebnisse 2007). In der Literatur gibt es lediglich eine Studie in einem Nierenarteriengefäßmodell der Ratte, in der ein Eisenchelator keinen protektiven Effekt zeigt, was an der dort verwendeten kurzen Lagerungszeit, dem schwächeren Eisenchelator und/oder der unterschiedlichen Gefäßart liegen könnte (Bartels-Stringer, M. et al., 2004).

Chlorid und kälteinduzierte Zellschädigung

In den aktuellen Untersuchungen zeigte eine chloridreiche Lösung bei der Kaltlagerung von Schweineaortensegmenten ein signifikant besseres Endothelzellüberleben nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung (Abbildung 17). Diese Ergebnisse stehen im starken Widerspruch zu Ergebnissen in Hepatozyten, da Konzentrationen von $\geq 40-50$ mM Chlorid isolierte Hepatozyten bei Kälteexposition schädigen (Rauen, U. et al., 2007). Weiterhin werden Pankreasinseln (Straube, S. et al. 2008, unveröffentlichte Ergebnisse) und Alveolarepithelzellen (Pizanis, N. et al. 2007, unveröffentlichte Ergebnisse) durch hohe Chloridkonzentrationen bei Kaltlagerung geschädigt. Deswegen wurden hier, um modell- von zelltypspezifischen Unterschieden zu diskriminieren, zusätzlich Versuche mit primärkultivierten Schweineaortenendothelzellen und isolierten Leberendothelzellen durchgeführt. Die isolierten Zellen zeigten dabei, wie die Schweineaortenendothelzellen im Gefäß, ein chloridabhängiges Überleben (Abbildung 18), so dass es sich hierbei wahrscheinlich um einen zelltypspezifischen Effekt handelt.

Bezüglich der Morphologie isolierter Schweineaortenendothelzellen scheint es, dass hier ein eisenunabhängiger, chloridabhängiger Mechanismus vorliegt, da die in Lösung 4 kaltgelagerten und wiedererwärmten Endothelzellen im Vergleich zu den in Lösung 3 gelagerten Endothelzellen einen intakten Monolayer zeigten (Abbildung 19). Es gibt erste Hinweise, dass eine hohe extrazelluläre Chloridkonzentration während der Kaltlagerung bei Wiedererwärmung isolierter Schweineaortenendothelzellen im Zusammenhang mit einer verbesserten Protektion des Zytoskeletts, insbesondere des F-Aktins, steht (Knoop, S. et al.

2007, unveröffentlichte Ergebnisse). Chloridkanäle der Plasmamembran spielen weiterhin in diversen Modellen der Apoptose eine Rolle. Hierbei handelt es sich meistens um eine Beteiligung an der apoptotischen Zellvolumenabnahme (Lang, F. et al., 2005) oder an der intrazellulären pH-Regulation (Fujita, H. et al., 1999). Der genaue molekulare Mechanismus der Protektion durch eine hohe extrazelluläre Chloridkonzentration bei Endothelzellen ist bisher jedoch noch unklar. Die ältere Hypothese der Kälteschädigung, nämlich dass Chlorid schädlich sein soll (Hochachka, 1986; Belzer, F. O. et al., 1988; Blankensteijn, J. D. et al., 1991; Clavien, P.-A. et al., 1992), konnte für Endothelzellen hier widerlegt werden.

Kalium und Endothelzellschädigung

Der Befund, dass eine kaliumreiche Lösung das Endothelzellüberleben (Abbildung 20, Lösung 7 vs. 6), besser schützt ist überraschend. Es gibt nur wenige Studien, in denen einer hohen Kaliumkonzentration keine schädigenden Auswirkungen auf das Endothel zugeschrieben werden (von Oppell, U. O. et al., 1990; Evora, P. R. et al., 1992). In der überwiegenden Zahl der Publikationen wird Kalium als endotheltoxisch beschrieben (Mankad, P. S. et al., 1991; Pearl, J. M. et al., 1994; Lee, J. et al., 1996). Allerdings wurden in diesen Studien über den Effekt von Kalium auf das Gefäßendothel unterschiedliche komplexe Konservierungslösungen mit unterschiedlichem pH-Wert, unterschiedlicher Osmolarität und/oder Ionenzusammensetzung und Osmolyten verglichen, so dass nicht klar zwischen dem Effekt von Kalium und dem anderer möglicherweise schädigender Mechanismen unterschieden werden konnte. Obwohl in der optimierten Lösung 8 der Vorteil hinsichtlich Endothelzellüberleben nicht weiter nachweisbar war (Abbildung 22, Lösung 8 vs. 9), war das mitochondriale Membranpotential als funktioneller Parameter besser erhalten (Abbildung 26). Eine aktuelle Studie in der ebenfalls die hier entwickelten Lösungen eingesetzt wurden, bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit und zeigt sowohl bei der endothelabhängigen, als auch -unabhängigen Relaxation von Mesenterialgefäßen der Ratte den protektiven Effekt einer hohen Kaliumkonzentration und nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung in der hier entwickelten kaliumreichen Lösung eine signifikant

bessere Vasoreaktion als in der natriumhaltigen Kontrolle (Zatschler, B. et al., 2009). Möglicherweise verhindert eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration während der Kallagerung einen Kaliumausstrom aus den Gefäßendothelzellen (Collins, G. M. et al., 1969; D'Alessandro, A. M. et al., 1994) und so die Einleitung der Apoptose (Lang, F. et al., 2005).

Natrium und kälteinduzierte Schädigung

Bereits die Veröffentlichungen von Fuckert et al. und Gizewski et al. zeigen Befunde, die mit der allgemein akzeptierten Rolle von Natrium in der Pathogenese der kälteinduzierten Schädigung nicht in Einklang zu bringen sind (Gizewski, E. R. et al., 1997; Fuckert, O. et al., 2000). Die Diskrepanz zu den älteren Ergebnissen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die älteren Studien, die eine zelluläre Natriumakkumulation zeigten, bei kombinierter Hypothermie und Hypoxie durchgeführt wurden (Fuckert, O. et al., 2000). In dem hier verwendeten Gefäßmodell war das Endothel dem atmosphärischen Sauerstoff ausgesetzt, der sich in kalten Lösungen besser physikalisch löst und so nicht der Hypoxie ausgesetzt (Buderus, S. et al., 1989; Mertens, S. et al., 1990). In partieller Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fuckert et al. und Gizewski et al. spielte die Natriumkonzentration in den aktuellen Untersuchungen zur kälteinduzierten Endothelzellschädigung eine untergeordnete Rolle, wie der Vergleich zwischen der natriumarmen Lösung 2 und der natriumreichen Lösung 3 zeigt (Abbildung 17). Im direkten Vergleich von hohen Natrium- und Kaliumkonzentrationen in chloridhaltigen, eisenchelatorhaltigen Lösungen jedoch zeigten natriumreiche Lösungen schlechtere Ergebnisse (siehe Diskussion, Kalium und Endothelzellschädigung), so dass Natrium hier möglicherweise doch, nach dem Einfluss von Eisenchelator und extrazellulärer Chloridkonzentration, eine kleine, dritte Rolle spielen könnte.

Basislösung

In der optimierten Lösung wurde *N*-Acetylhistidin als Puffersystem eingesetzt, da Histidin (pK 6,2) zwar ein natürlicher Puffer ist, der einen pK -Wert besitzt, der dem optimalen pK -Wert von 6,8 relativ nahe kommt, aber in der Leberendothelzellkultur toxische Effekte aufweist (Rauen, U. et al., 2007). Als Schädigungsmechanismus handelt es sich dabei am ehesten um eine Bildung redoxaktiver Eisen-Histidin-Komplexe, die auf der mäßigen Affinität des Eisenchelators Histidin zum Eisen (Stabilitätskonstante für 2:1 Komplexe mit Fe^{2+} : $\log \beta_2 = 10,43$ (Williams, D. R., 1970)) beruhen und durch das reaktive und ungünstig substituierte Imidazol-Gerüst im Histidin (Good, N. E. et al., 1972) begünstigt werden. Von den *N*-substituierten Histidinderivaten, die bei erhaltener Pufferkapazität keine Toxizität zeigen, ist das *N*-Acetylhistidin (pK 7,2) ebenfalls eine natürliche Verbindung. Die maximale Pufferkapazität des Histidins liegt im leicht azidotischen Bereich, auf den die modifizierten Lösungen hier eingestellt worden waren, und wird für *N*-Acetylhistidin ähnlich sein. Generell ist die für die Gefäßkonservierung benötigte Pufferkapazität jedoch, verglichen mit der der Organkonservierung, geringer, da das relative Volumen der Konservierungslösung, dem das Gewebe ausgesetzt ist, wesentlich größer ist. pH-Wert-Messungen nach 21 Tagen Kaltlagerung zeigten, dass *N*-Acetylhistidin (30 mM) als Puffer für die Gefäßlagerung suffizient ist und trotz der glykolytisch hoch aktiven Endothelzellen (Mertens, S. et al., 1990; Davidson, S. M. et al., 2007) für einen nahezu konstanten pH-Wert sorgt (Tabelle 7). Auffällig ist, dass die ungepufferte physiologische Kochsalzlösung, trotz der einfachen ionalen Zusammensetzung, relativ gute Ergebnisse bezüglich der Zellvitalität (Abbildung 23) zeigte. Klöppel et al. hatten in einem Hepatozytenmodell ähnliche Befunde (Klöppel, K. et al., 1994), wobei der Mechanismus unklar bleibt, am ehesten aber durch die Azidose mit der Verminderung der intrazellulären Enzymaktivitäten erklärt werden kann. In derselben Studie wurde auch TRIS als Puffer untersucht, der bei pH 7,8 eine starke Zellschädigung verursachte. In dieser Studie ist die pH-Regulation bei Lagerung in Perfadex für 21 Tage durch 1 mM TRIS als Puffer unzureichend und führte zu einem starken pH-Abfall (Tabelle 7). Da der pK -Wert, und so die maximale Pufferkapazität, von TRIS bei pH 8,3 liegt, ist dieser Effekt nachvollziehbar und TRIS für die Einstellung leicht azidotischer pH-Werte absolut

ungeeignet. Der pH-Wert der Lösungen wurde auf 7,0 eingestellt, da eine leichte Azidose gegen mehrere Mechanismen der Zellschädigung protektiv ist (Koop, A. et al., 1992; Nishimura, Y. et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden, da sowohl die Vitalität (Abbildung 22), als auch das mitochondriale Membranpotential (Abbildung 26) bei pH 7,0 im Vergleich zu pH 7,4 signifikant besser erhalten waren. Aspartat und α -Ketoglutarat wurden zu der zugrunde liegenden Organkonservierungslösung hinzugefügt, um Intermediate des Zitratzyklus (α -Ketoglutarat) oder deren Vorstufen (Aspartat zur Bildung von Oxalacetat) bereit zu stellen (Rauen, U. et al., 2008), und wurden hier nicht weiter untersucht. Glukose diente als Substrat für die glykolytisch hoch aktiven Endothelzellen (Mertens, S. et al., 1990; Davidson, S. M. et al., 2007).

Einsatz von Eisenchelatoren

Das Hydroxamsäurederivat LK 614 war bereits bei geringen Konzentrationen hocheffektiv, was auf eine bessere Membrangängigkeit als Desferal hinweist. Das aromatische Ringsystem gewährt dem Molekül eine genügend hohe Lipophilie, um Membranen zu permeieren. Die Methylierung der Hydroxamsäuregruppe war nötig, um Toxizitäten zu vermeiden, wohingegen die beiden Methoxygruppen am aromatischen Ringsystem die Eisenchelatisierung verbesserten (Rauen, U. et al. 2006, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Kombination von geringen Konzentrationen des hydrophilen (Desferal) und lipophilen Eisenchelators (LK 614) schien vorteilhaft (Abbildung 21), und könnte für die Hypothese sprechen, dass die chelatisierende Wirkung des LK 614 vorrangig in der Frühphase der Kaltlagerung liegt und in der späteren Phase der Kaltlagerung durch das schlechter membrangängige, aber stärkere Desferal (Komplexbildungskonstante für 1:1 Komplexe mit Fe^{3+} : $\log \beta_2 = 30,6$; Singh, S. et al., 1995) übernommen wird. Die Komplexbildungskonstante von LK 614 ist deutlich geringer als die des Desferals, wobei hier bisher lediglich qualitative und keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass hohe Konzentrationen der potenten Eisenchelatoren Desferal und LK 614, die hier in Kombination eingesetzt wurden, toxische Effekte haben können (Abbildung 21).

Diskutiert wird dabei am ehesten ein intrazellulärer Eisenmangel, der zur Hemmung eisenabhängiger Enzyme führt (Chaston, T. B. et al., 2003).

Vergleich zwischen kälteinduzierter Schädigung isolierter Endothelzellen und Endothelzellen in Schweineaortensegmenten

Isolierte Endothelzellen und Endothelzellen in Schweineaortensegmenten zeigten beide eine eisenabhängige Schädigung und einen protektiven Effekt durch hohe extrazelluläre Chloridkonzentrationen. Isolierte und primärkultivierte Schweineaortenendothelzellen waren jedoch wesentlich kältesensitiver als das Endothel kaltgelagerter Schweineaortensegmenten (vgl. Abbildung 17 mit 18). Die Anhaftung der Endothelzellen an die Matrix im Gefäß könnte hier einen Pro-survival Faktor gegen die Apoptose durch Ablösung von der subendothelialen Matrix (Anoikis) darstellen und so die Zellen im intakten Gefäß schützen (Fawzi, A. et al., 2001).

Mitochondriales Membranpotential

Wie in verschiedenen isolierten Zelltypen (Kerkweg, U. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2006), waren auch die Mitochondrien des Schweineaortenendothels ein Target der kälteinduzierten, eisenabhängigen Schädigung, die durch eine optimierte Basislösung und Eisenchelatoren verringert werden konnte (Abbildungen 25, 26). Zellen im Gefäßmodell sind auch hinsichtlich dieses Parameters weniger sensibel als kultivierte Endothelzellen (Kerkweg, U. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2006). Unmittelbar nach 7 Tagen Kaltlagerung kam es, trotz optimierter Fluoreszenzfärbung, durch ein vermindertes Membranpotential zu einer verringerten Farbstoffaufnahme (Abbildung 24 a). Nach 3 Stunden Wiedererwärmung kam es dann bei in Lösung 8 ohne Chelatorzusatz gelagerten Segmenten wieder zu einer Zunahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abbildung 24 b). Dieses Phänomen ist bisher nur in kultivierten Endothelzellmodellen gezeigt worden (Eberl, T. et al., 1999; Kerkweg, U. et al., 2003; Rauen, U. et al., 2006). Bei in Lösung 8 + optimierter Chelatorkonzentration

gelagerten Gefäßsegmenten war ein gut erhaltenes mitochondriales Membranpotential der Endothelzellen messbar (Abbildung 25 c, d, 26), wohingegen bei aktuell klinisch eingesetzten Lösungen teilweise schon nach einer Woche kein mitochondriales Membranpotential mehr nachzuweisen war (Abbildung 25 a, 26). Dabei spielen insbesondere der pH-Wert und die Kaliumkonzentration eine besondere Rolle (Abbildung 26). Möglicherweise erklärt die hohe Kaliumkonzentration auch das recht gut erhaltene mitochondriale Membranpotential der Endothelzellen von in UW-Lösung gelagerten Aortensegmenten.

Mitochondriale Morphologie

Die mitochondriale Morphologie von Endothelzellmitochondrien wird durch Schädigungsmechanismen und intramitochondriale Reparaturmechanismen beeinflusst (Jendrach, M. et al., 2008). Bei Kaltlagerung kam es hier zur Fragmentation der Endothelzellmitochondrien, der so genannten „Fission“ (Abbildung 24 a) (Bereiter-Hahn, J. et al., 1994). Bei Wiedererwärmung kam es dann in den in Lösung 8 gelagerten Gefäßsegmenten wieder zur „Fusion“ der Fragmente (Lösung 8, Abbildung 24 b). In HTK + 1 mM Desferal gelagerten Gefäßsegmenten blieb die „Fusion“ aus und die Mitochondrienfragmente waren kleiner (Abbildung 25 b) als die in Lösung 8 unmittelbar nach Kaltlagerung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Kerkweg et al., die an isolierten Endothelzellen ebenfalls eine durch Kälte auslösbare, prinzipiell reversible Mitochondrienfragmentation (Abbildung 24) nachweisen konnten (Kerkweg, U. et al., 2003).

Pyren-FNOCT-Messungen

Die freigesetzte NO-Menge der Endothelzellen ist (unter Ausgangsbedingungen) messbar, entspricht etwa 1/100 der Menge, die von durch Lipopolysacchariden stimulierten Makrophagen freigesetzt wird und stellt somit einen plausiblen Wert dar (Hornig, F. S. et al., 2006). Diese geringen NO-Konzentrationen geben ein

schwaches Signal und bilden vorerst die Sensitivitätsgrenze. Es ist wahrscheinlich, dass es durch den mechanischen Stress während der Entnahmeprozedur am Schlachthof und durch das Präparieren im Labor zu Scherkräften kam, die zu einem Calciumeinstrom führten (Moerenhout, M. et al., 2001) und/oder dass es durch den Temperatursprung zwischen der Körperkerntemperatur des Schweines und der raumtemperierten Transportlösung zu einem verstärkten intrazellulären Calciumeinstrom kam (Upadhy, G. A. et al., 2003), der durch den kurzfristigen Einsatz von EGTA (aus technischen Gründen erst nach Manipulation möglich) nicht aufzuhalten war, so dass sich im anschließenden Versuch durch die Zugabe des Calciumionophors Ionomycin keine höhere NO-Freisetzung induzieren ließ. Nichtsdestotrotz konnte das Fluoreszenzsignal auch in den offensichtlich voraktivierten Endothelzellen durch N^G -Monomethyl-L-Arginin inhibiert werden, so dass es sich wirklich um die Freisetzung von NO handelte. Die teilweise Aufnahme des Pyren-FNOCT in Zellen (Abbildung 15, Legende) kann bei unterschiedlicher Vorschädigung der Aortensegmente nicht als konstant angesehen werden und macht, da das Signal ohnehin schon an der Nachweisgrenze und klein im Vergleich zum Background war, Pyren-FNOCT daher ungeeignet für die Bestimmung der NO-Freisetzung von Gefäßendothelzellen nach der Sequenz Kaltlagerung und Wiedererwärmung. Dennoch ist die geringe NO-Freisetzung hier in den (ungelagerten) Kontrollgefäßen mit Pyren-FNOCT nachweisbar und stellt die erste Anwendung dieses Fluoreszenzindikators im Gewebe dar.

Thrombozytenadhäsion

Die Kaltlagerung isolierter Gefäßendothelzellen induziert eine erhöhte Thrombozytenadhäsion (Upadhy, G. A. et al., 2002) und zerstört den endothelialen Monolayer von Gefäßen (van Leeuwen, E. B. et al., 2000; Neil, D. A. et al., 2002). Dies kann zu Thrombose und Gefäßgraft-Verschluss führen, was einen möglichen Verlust von nachgeschalteten Organen oder Gewebe nach sich zieht (Pinna, A. D. et al., 1996). Nach 14 Tagen Kaltlagerung und Wiedererwärmung war in der optimierten Lösung 8 die Thrombozytenadhäsion im Vergleich zur HTK-Lösung signifikant und zur Perfadex-Lösung tendenziell

reduziert (Abbildung 27). Die relativ geringe Thrombozytenadhäsion nach Kaltlagerung in der bezüglich anderer Parameter eher schlechten Perfadex-Lösung lässt sich durch das Dextran als Komponente der Perfadex-Lösung erklären, das sich möglicherweise trotz Waschen der Aortensegmente an die Endothelzellen anlagert und dort die kollagenabhängige Thrombozytenadhäsion verhindert (Robless, P. et al., 2004).

Optimierte Lösung

Es gibt wenig Daten zur Endothelschädigung bei Langzeitlagerung von Gefäßen und in den meisten Studien wird unter „Langzeitlagerung“ eine Dauer von 24 Stunden verstanden, die bei Lagerung in HTK (Eberl, T. et al., 1999) und Perfadex (Wilson, C. H. et al., 2004) zu reversiblen ultrastrukturellen Veränderungen des Endothels führte. Für die langfristige Kaltlagerung von Gefäßen jedoch, legen die in dieser Arbeit gezeigten Daten den Einsatz von Konservierungslösung 8 mit optimierten Eisenchelatoren nahe, wobei die modellabhängigen Unterschiede von isolierten Endothelzellen und Aortendothelzellen *in situ* auf die klinische Relevanz des Gefäßmodells hinweisen. Die neue Lösung 8 mit optimierter Chelatorkonzentration ist daher in anderen Modellen mit kleinen Gefäßen, wie Mesenterialgefäßen der Ratte (Zatschler, B. et al., 2009) und humanen Mammaria-Interna-Arterien (Garbe, S. et al., 2008) hinsichtlich weiterer funktioneller Tests getestet worden und zeigte eine signifikant bessere endothelabhängige und -unabhängige Reaktion als klinisch eingesetzte Konservierungslösungen. Insbesondere die verbesserte Lagerung von humanen Mammaria-Interna-Arterien, einem wichtigen Bypass-Gefäß in der kardiovaskulären Chirurgie, ist dabei zusätzlich von großem klinischen Interesse. Aktuell wird die neue Lösung *in vitro* in einem humanen Venenmodell, an humaner Arteria radialis und in *in vivo*-Versuchen mit in Lösung 8 gelagerten Gefäßgrafts in der Ratte getestet.

Ausblick

Auf Grund der positiven Ergebnisse in verschiedenen Modellen soll im Sommer 2009 eine klinische Studie mit humanen Mammaria-Interna-Arterien begonnen werden.

6. Zusammenfassung

Dem Einsatz und der Lagerung von Gefäßtransplantaten kommt in der Klinik eine wachsende Bedeutung zu. Die Gefäße werden dabei in den momentan klinisch gebräuchlichen Konservierungslösungen gelagert, wobei es zu einer Schädigung der funktionell bedeutsamen Endothelzellen kommt.

Die Sequenz Kälte/Wiedererwärmung führt in kultivierten Endothelzellen über einen Anstieg des chelatisierbaren Eisenpools mit konsekutiver Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu einer kälteinduzierten Schädigung. Ob diese Schädigung auch am Endothel im Gefäßmodell auftritt und wie die kalte Lagerung von Blutgefäßen optimiert werden kann, war Gegenstand dieser Arbeit.

Analog zur Schädigung isolierter Endothelzellen, war auch die Schädigung von Endothelzellen in Schweineaortensegmenten in allen Lösungen (partiell eisenabhängig (14 Tage 4 °C, 3 Stunden 37 °C: Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung $66 \pm 7\%$, HTK + 1 mM Desferal $40 \pm 10\%$ Propidiumjodid-positive Endothelzellen) Anschließend wurde eine aminosäurehaltige, *N*-Acetylhistidin-gepufferte Basislösung optimiert. Diese optimierte Lösung mit pH 7,0 und Chlorid sowie Kalium als Hauptionen führte zu einer deutlichen Verbesserung des Endothelzellüberlebens. Die Kombination von Desferal und dem neuen lipophilen Eisenchelator LK 614 führte zu einer weiteren Verbesserung, so dass nach 21 Tagen Kaltlagerung und 3 Stunden Wiedererwärmung nur noch $10 \pm 1\%$ der Endothelzellen Propidiumjodid-positiv waren. In dieser optimierten Lösung waren sowohl das Endothelzellüberleben, als auch das mitochondriale Membranpotential signifikant besser erhalten als in den klinisch eingesetzten Lösungen HTK, University of Wisconsin, Perfadex und physiologischer Kochsalzlösung. Die Thrombozytenadhäsion war ebenfalls signifikant vermindert verglichen mit in HTK-Lösung gelagerten Aortensegmenten.

Die kälteinduzierte Schädigung am Endothel von Schweineaorten ist, wie die Schädigung kultivierter Endothelzellen, z.T. über chelatisierbares Eisen vermittelt. Die hier entwickelte Gefäßprotektionslösung (optimierte Basislösung mit Eisenchelatoren in optimierter Konzentration) verbessert das Endothelzellüberleben und die Endothelzellfunktion bei/nach Kaltlagerung von Gefäßen erheblich und soll nun für einen klinischen Einsatz weiter evaluiert werden.

7. Literaturverzeichnis

Bahde, R., Palmes, D., Gemsa, O., Minin, E., Stratmann, U., de Groot, H., Rauen, U., Spiegel, H. U. (2008): Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution. *J. Surg. Res.* 146, 49-56.

Bartels-Stringer, M., Kramers, C., Wetzels, J. F., Russel, F. G., de Groot, H., Rauen, U. (2003): Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology* 47, 82-91.

Bartels-Stringer, M., Terlunen, L., Siero, H., Russel, F. G., Smits, P., Kramers, C. (2004): Preserved vascular reactivity of rat renal arteries after cold storage. *Cryobiology* 48, 95-98.

Belzer, F. O., Southard, J. H. (1988): Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45, 673-676.

Bereiter-Hahn, J., Vöth, M. (1994): Dynamics of mitochondria in living cells, shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Technol.* 27, 198-219.

Berndt, M. C., Shen, Y., Dopheide, S. M., Gardiner, E. E., Andrews, S. K. (2001): The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb. Haemost.* 86, 178-188.

Blankensteijn, J. D., Terpstra, O. T. (1991): Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 13, 1235-1250.

Bretschneider, H. J. (1980): Myocardial protection. *Ann. Thorac. Surg.* 28, 295-302.

Bretschneider, H. J., Helmchen, U., Kehrer, G. (1988): Nierenprotektion. *Klin. Wochenschr.* 66, 817-827.

Brunius, U., Bergentz, S. E., Ekman, H., Gelin, L. E., Westberg, G. (1968): The cadaveric kidney in clinical transplantation. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2, 15-23.

Buderus, S., Siegmund, B., Spahr, R., Krutzfeldt, A., Piper, H. M. (1989): Resistance of endothelial cells to anoxia-reoxygenation in isolated guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* 257, H488-493.

Caldwell-Kenkel, J. C., Currin, R. T., Tanaka, Y., Thurman, R. G., Lemasters, J. J. (1989): Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 10, 292-299.

Chaston, T. B., Richardson, D. R. (2003): Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am. J. Hematol.* 73, 200-210.

Clavien, P.-A., Harvey, P. R. C., Strasberg, S. M. (1992): Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53, 957-978.

Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M., Terasaki, P. I. (1969): Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 2, 1219-1222.

D'Alessandro, A. M., Southard, J. H., Love, R. B., Belzer, F. O. (1994): Organ preservation. *Surg. Clin. North. Am.* 74, 1083-1095.

Davidson, S. M., Duchon, M. R. (2007): Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ. Res.* 100, 1128-1141.

Del Gaudio, M., Grazi, G. L., Ercolani, G., Ravaioli, M., Varotti, G., Cescon, M., Vetrone, G., Ramacciato, G., Pinna, A. D. (2005): Outcome of hepatic artery reconstruction in liver transplantation with an iliac arterial interposition graft. *Clin. Transplant.* 19, 399-405.

Eberl, T., Salvenmoser, W., Rieger, G., Gorny, I., Heiss, V., Kumpitsch, B., Gnaiger, E., Margreiter, R. (1999): Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J. Surg. Res.* 82, 253-260.

Evora, P. R., Pearson, P. J., Schaff, H. V. (1992): Crystalloid cardioplegia and hypothermia do not impair endothelium-dependent relaxation or damage vascular smooth muscle of epicardial coronary arteries. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104, 1365-1374.

Fawzi, A., Vuori, K. (2001): Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-Flip and implications for anoikis. *J. Cell Biol.* 152, 633-643.

Ferrari, E. R., von Segesser, L. K. (2006): Arterial grafting for myocardial revascularization: how better is it? *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 6.

Frank, A., Rauen, U., de Groot, H. (2000): Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J. Hepatol.* 32, 58-66.

Fuckert, O., Rauen, U., de Groot, H. (2000): A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK₁ cells. *Transplantation* 70, 723-730.

Fujita, H., Ishizaki, Y., Yanagisawa, A., Morita, I., Murota, S. I., Ishikawa, K. (1999): Possible involvement of a chloride-bicarbonate exchanger in apoptosis of endothelial cells and cardiomyocytes. *Cell Biol. Int.* 23, 241-249.

Garbe, S., Zatschler, B., Dieterich, P., Rauen, U., Matschke, K., Deussen, A. (2008): Graft cold preservation in new Z44 solution over 2 weeks: Results on rat superior mesenteric artery (RSMA) and human internal mammary artery (HIMA). *Transplantationsmedizin* Suppl. 2, 118-119.

Gizewski, E. R., Rauen, U., Kirsch, M., Reuters, I., Diederichs, H., de Groot, H. (1997): Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem. J.* 322, 693-699.

Good, N. E., Izawa, S. (1972): Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol.* 24, 53-68.

Hochachka (1986): Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-241.

Hornig, F. S., Korth, H. G., Rauen, U., de Groot, H., Sustmann, R. (2006): Synthesis and Properties of a pH-Insensitive Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap (FNOCT). *Helv. Chim. Acta* 89, 2281-2296.

Huang, H., Salahudeen, A. K. (2002): Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: a critical step in cold storage-induced renal injury. *Am. J. Transplant.* 2, 631-639.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269.

Jaeschke (1991): Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.* 79, 115-136.

Jauregui, H. O., Hayner, N. T., Driscoll, J. L., Williams-Holland, R., Lipsky, M. H., Galletti, P. M. (1981): Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult

rat hepatocytes-freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro* 17, 1100-1110.

Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J. (2008): Short- and long term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8, 293-204.

Jessel, S. (2008). Jahresbericht 2007 der DGFG. Hannover, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation.

Jia, L., Dourmashkin, R. R., Newland, A. C., Kelsey, S. M. (1997): Mitochondrial ultracondensation, but not swelling, is involved in TNF alpha-induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Leuk. Res.* 21, 973-983.

Keefer, L. K., Nims, R. W., Davis, K. M., Wink, D. A. (1996): "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268, 281-293.

Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., Rauen, U. (2002): Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 35, 560-567.

Kerkweg, U., Jacob, M., de Groot, H., Mannherz, H. G., Rauen, U. (2003): Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 76, 501-508.

Keshavjee, S. H., Yamazaki, F., Cardoso, P. F., McRitchie, D. I., Patterson, G. A., Cooper, J. D. (1989): A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 98, 529-534.

Kieffer, E., Gomes, D., Chiche, L., Fléron, M. H., Koskas, F., Bahnini, A. (2004): Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J. Vasc. Surg.* 39, 1009-1017.

Klöppel, K., Gerlach, J., Neuhaus, P. (1994): Untersuchungen zur Wirkung von Puffersubstanzen in Leberkonservierungslösungen auf Hepatozyten in einem Modell der In-vitro-Konservierung und Reoxygenierung. *Langenbecks Arch. Chir.* 379, 264-270.

Koop, A., Piper, H. M. (1992): Protection of energy status of hypoxic cardiomyocytes by mild acidosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 55-65.

Lang, F., Föller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A., Huber, S. M. (2005): Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 205, 147-157.

Lee, J., Drinkwater, D. C. J., Laks, H., Chong, A., Blitz, A., Chen, M. A., Ignarro, L. J., Chang, P. (1996): Preservation of endothelium-dependent vasodilation with low-potassium University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 112, 103-110.

Lemasters, J. J., Thurman, R. G. (1993): Hypoxia and reperfusion injury to liver. *Prog. Liver. Dis.* 11, 85-114.

Lopez Santamaria, M., Vazquez, J., Gamez, M., Murcia, J., Bueno, J., Martinez, L., Paz Cruz, J. A., Reinoso, F., Bourgeois, P., Diaz, M. C., Hierro, L., Camarena, C., de la Vega, A., Frauca, E., Jara, P., Tovar, J. A. (1996): Donor vascular grafts for arterial reconstruction in pediatric liver transplantation. *J. Pediatr. Surg.* 31, 600-603.

Mankad, P. S., Chester, A. H., Yacoub, M. H. (1991): Role of potassium concentration in cardioplegic solutions in mediating endothelial damage. *Ann. Thorac. Surg.* 51, 89-93.

McKeown, C. M., Edwards, V., Phillips, M. J., Harvey, P. R., Petrunka, C. N., Strasberg, S. M. (1988): Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 46, 178-191.

McNicol, A. (1996): Platelet preparation and estimation of functional responses. *In*: S. P. Watson and K. S. Authi (Eds.): *The Practical Approach Series.*, S. 4-8. Oxford: IRL Press

Mertens, S., Noll, T., Spahr, R., Krutzfeldt, A., Piper, H. M. (1990): Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 3, H689-94.

Moerenhout, M., Vereecke, J., Himpens, B. (2001): Mechanism of intracellular Ca^{2+} -wave propagation elicited by mechanical stimulation in cultured endothelial CPAE cells. *Cell Calcium* 29, 117-123.

Mohr, A., Talbiersky, P., Korth, H. G., Sustmann, R., Boese, R., Bläser, D., Rehage, H. (2007): A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations. *J. Phys. Chem. B.* 111, 12985-12992.

Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.

Neil, D. A., Lynch, S. V., Hardie, I. R., Effeney, D. J. (2002): Cold storage preservation and warm ischaemic injury to isolated arterial segments: endothelial cell injury. *Am. J. Transplant.* 2, 400-409.

Nishimura, Y., Romer, L. H., Lemasters, J. J. (1998): Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology* 27, 1029-1039.

Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.

Pearl, J. M., Laks, H., Drinkwater, D. C., Sorensen, T. J., Chang, P., Aharon, A. S., Byrns, R. E., Ignarro, L. J. (1994): Loss of endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107, 257-264.

Peters, S. C., Reis, A., Noll, T. (2005): Preparation of endothelial cells from micro- and macrovascular origin. In: S. Dhein, S. W. Mohr and M. Delmar (Eds.): *Practical Methods in Cardiovascular Research*, S. 619-622. Heidelberg: Springer.

Peters, S. M., Rauen, U., Tijssen, M. J., Bindels, R. J., van Os, C. H., de Groot, H., Wetzels, J. F. (1998): Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical-mediated cell injury. *Transplantation* 65, 625-632.

Pinna, A. D., Smith, C. V., Furukawa, H., Starzl, T. E., Fung, J. J. (1996): Urgent revascularization of liver allografts after early hepatic artery thrombosis. *Transplantation* 62, 1584-1487.

Rauen, U., Hanssen, M., Lauchart, W., Becker, H. D., de Groot, H. (1993): Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. *Transplantation* 55, 469-473.

Rauen, U., Noll, T., Piper, H. M., Lauchart, W., Becker, H. D., de Groot, H. (1994): Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology* 31, 144-153.

Rauen, U., Elling, B., de Groot, H. (1997): Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 392-400.

Rauen, U., Elling, B., Gizewski, E. R., Korth, H. G., Sustmann, R., de Groot, H. (1997): Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 17-24.

Rauen, U., Reuters, I., Fuchs, A., de Groot, H. (1997): Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology* 26, 351-357.

Rauen, U., de Groot, H. (1998): Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1316-1323.

Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H. G., de Groot, H. (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 13, 155-168.

Rauen, U., Petrat, F., Li, T., de Groot, H. (2000): Hypothermia injury/cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O_2^-/H_2O_2 formation. *FASEB J.* 14, 1953-1964.

Rauen, U., de Groot, H. (2002): Mammalian cell injury induced by hypothermia - the emerging role of reactive oxygen species. *Biol. Chem.* 383, 477-488.

Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2003): Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1664-1678.

Rauen, U., de Groot, H. (2004): New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J. Invest. Med.* 52, 299-309.

Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2004): Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 40, 607-615.

Rauen, U., Kerkweg, U., Wusteman, M. C., de Groot, H. (2006): Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron: implications for corneal preservation. *Cornea* 25, 68-77.

Rauen, U., Kerkweg, U., de Groot, H. (2007): Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 54, 77-86.

Rauen, U., Klempt, S., de Groot, H. (2007): Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64, 192-205.

Rauen, U., de Groot, H. (2008): Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology* 56, 88-92.

Rauen, U., Wu, K., Witzke, O., de Groot, H. (2008): Custodiol-N – a new, mechanism-based organ preservation solution. *Cryobiology* 57, 331.

Redondo, J., Manso, A. M., Pacheco, M. E., Hernández, L., Salaices, M., Marín, J. (2000): Hypothermic storage of coronary endothelial cells reduces nitric oxide synthase activity and expression. *Cryobiology* 41, 292-300.

Robless, P., Okonko, D., Mikhailidis, D. P., Stansby, G. (2004): Dextran 40 reduces in vitro platelet aggregation in peripheral arterial disease. *Platelets* 15, 215-222.

Rosser, B. G., Gores, G. J. (1995): Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108, 252-275.

Salahudeen, A. K., Huang, H., Patel, P., Jenkins, J. K. (2000): Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation* 70, 1424-1431.

Salahudeen, A. K., Joshi, M., Jenkins, J. K. (2001): Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 72, 798-804.

Salahudeen, A. K., Huang, H., Joshi, M., Moore, N. A., Jenkins, J. K. (2003): Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am. J. Transplant.* 3, 273-280.

Schaeffer, U., Tanner, B., Strohschneider, T., Stadtmuller, A., Hannekum, A. (1997): Damage to arterial and venous endothelial cells in bypass grafts induced by several solutions used in bypass surgery. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 45, 168-171.

Schroeder, C., Heintz, A., Pexa, A., Rauen, U., Deussen, A. (2007): Preclinical evaluation of coronary vascular function after cardioplegia with HTK and different antioxidant additives. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 31, 821-826.

Singh, S., Khodr, H., Taylor, M. I., Hider, R. C. (1995): Therapeutic iron chelators and their potential side-effects. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 127-137.

Stegemann, J., Koetting, I., Hirner, A., Rauen, U., Minor, T. (2009): Use of a new modified HTK solution for machine preservation of marginal liver grafts. *J. Surg. Res.*, im Druck.

Upadhyaya, G. A., Strasberg, S. M. (2002): Platelet adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation* 73, 1764-1770.

Upadhyya, G. A., Topp, S. A., Hotchkiss, R. S., Anagli, J., Strasberg, S. M. (2003): Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 37, 313-323.

Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelmi, P., Bertè, F., Freitas, I. (2005): Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 367-374.

van Leeuwen, E. B., Molema, G., van Luyn, M. J., de Jong, K. P., Dijk, F., Slooff, M. J., Ruiters, M. H., van der Meer, J. (2000): Scanning electron microscopic analysis of endothelial cell coverage and quality in large vessels from multi-organ donors: effects of preservation on endothelial cell integrity. *Clin. Transplant.* 14, 246-251.

von Oppell, U. O., Pfeiffer, S., Preiss, P., Dunne, T., Zilla, P., Reichart, B. (1990): Endothelial cell toxicity of solid-organ preservation solutions. *Ann. Thorac. Surg.* 50, 902-910.

Welz, A., Stadtmuller, A., Schaffer, U., Strohschneider, T., Hannekum, A. (1991): Cytotoxicity of various crystalloid solutions to the endothelial cells of autologous grafts. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 39, 236-240.

Williams, D. R. (1970): Thermodynamic considerations in co-ordination. Part VII. Solubility of the histidine-H⁺ system and stability constants, free energies, enthalpies, and entropies of the protonation of histidine and tryptophan and of formation of their manganese(II), iron(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes. *J. Chem. Soc.*, 1550-1555.

Wilson, C. H., Stansby, G., Haswell, M., Cunningham, A. C., Talbot, D. (2004): Evaluation of eight preservation solutions for endothelial in situ preservation solution. *Transplantation* 78, 1008-1013.

Zacharias, A., Habib, R. H., Schwann, T. A., Riordan, C. J., Durham, S. J., Shah, A. (2004): Improved survival with radial artery versus vein conduits in coronary bypass surgery with left internal thoracic artery to left anterior descending artery grafting. *Circulation* 109, 1489-1496.

Zatschler, B., Dietrich, P., Müller, B., Kasper, M., Rauen, U., Deußen, A. (2009): Improved vessel preservation after 4 days cold storage. Experimental study in rat mesenteric artery. *J. Vasc. Surg.*, im Druck.

8. Abkürzungsverzeichnis

DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FNOCT	Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
LDH	Lactatdehydrogenase
LK 614	3,4-Dimethoxy- <i>N</i> -Methyl-Benzhydroxamsäure
MAHMA-NO	(<i>Z</i>)-1-{ <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -[6-(<i>N</i> -methylammoniumhexyl)Amino]}diazen-1-ium-1,2-diolat
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NMA	N^G -Monomethyl-L-Arginin
p <i>K</i>	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SNARF-1-AM	5-(und-6)-Carboxy SNARF-1 Acetoxymethylesteracetat
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. de Groot, Direktor des Instituts für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen, danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut, wissenschaftlich zu arbeiten.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rauen bedanken, die mich immer engagiert betreut hat, stets Zeit für wissenschaftliche Fragen und Diskussionen hatte und mir das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht, sowie mein Interesse auch zukünftig wissenschaftlich zu arbeiten geweckt hat.

Prof. Dr. Dr. h.c. Sustmann und Dr. Korth, danke ich für die Bereitstellung des Pyren-FNOCT und ihr Interesse an der Anwendung im Gefäßmodell.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamtes der Stadt Essen, die mich über die ganze Zeit mit Schweineaorten versorgt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Gesine Pless und Sven Knoop danke ich für Rat und Tat insbesondere bei technischen Fragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Birgit Podleska und Natalie Boschenkov für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern, meinem Bruder Ansgar und meiner Freundin Ann-Kristin Gausmann für ihre Unterstützung, das entgegengebrachte Verständnis und ihr Interesse an meiner Arbeit bedanken.

10. Lebenslauf

Name: Timo Wille, wohnhaft in Saarbrücken

geboren am: 20.05.1982 in Geseke

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1988-1992 Nicolaischule, Lippstadt

1992-2001 Ostendorf-Gymnasium, Lippstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/2001 8./SanRgt 5 in Rennerod, Übernahme als Sanitätsoffizieranwärter

Universitäre Ausbildung:

2002 – 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen

12/2008 Abschluss: Staatsexamen Medizin

Postuniversitäre Ausbildung:

12/2008 – 03/2009 Postuniversitäre modulare Ausbildung und Englischlehrgang des Bundessprachenamtes

03/2009 Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr