

**Reduktion frühischämischer Zellschäden in venösen Grafts mittels der
oxygenierten Celsiorlösung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Vorgelegt von Guido Zintl
aus Plattling**

2009

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Professor Dr. med. C. J. Preuße
2. Gutachter: Herr Privatdozent Dr. med. H. Wrigge

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.03.2009

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätskliniken, Bonn
Direktor Prof. Dr. med. A. Welz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Die Koronarchirurgie gestern und heute	8
1.2 Morphologische Unterschiede zwischen Arterien und Venen	9
1.3 Ursachen der Endothelzellschäden in venösen Grafts und mögliche Vermeidungsstrategien	10
1.4 Unterschiede zwischen kolloidalen und kristalloiden Lösungen	11
1.4.1 Die Celsiorlösung	13
1.5 Verschlussraten arterieller und venöser Grafts	14
1.5.1 Thrombose	14
1.5.2 Intimahyperplasie	15
1.5.3 Arteriosklerose	16
1.5.4 Apoptose	17
1.6 Ziel der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Die Versuchslösung Celsior	20
2.2 Chemikalien und Zusatzlösungen für den TUNEL-Test	20
2.3 Chemikalien und Zusatzlösungen für die H.E. Färbung	21
2.4 Geräte und sonstige Materialien	22
2.5 Versuchsaufbau	23
2.6 Versuchsdurchführung	24
2.7 TUNEL-Assay (TdT = terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)	25
2.7.1 Durchführung des TUNEL-Assay	27
2.8 Durchführung der H.E.-Färbung	29
2.9 Bestimmung der Morphologie	29
2.10 Auswertung mit der analySIS [®] -Software 3.0	30
2.11 Statistik	30

3.	Ergebnisse	31
3.1	Patientenkollektiv	31
3.2	Messwerte Celsiuslösung	31
3.3	Histologische Auswertung	32
3.4	Apoptoseraten in beiden Lösungen	35
3.5	Statistik	36
3.5.1	Endothel	37
3.5.2	Subendothel	39
3.5.3	Media	41
3.5.4	Adventitia	43
4.	Diskussion	45
5.	Zusammenfassung	54
6.	Anhang	56
7.	Literaturverzeichnis	59
8.	Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis

Angiotensin Converting Enzym	ACE
Antithrombin III	AT III
Arteria mammaria interna	IMA
Basic fibroblast growth factor	bFGF
Epidermal growth factor	EGF
Diagonalast	Dg
Desoxyribonukleinsäure	DNA
Gewebsplasminogenaktivator	tPA
Hämatoxylin-Eosin	H.E.
Interleukin-1	IL-1
Koronare Herzkrankheit	KHK
Platelet derived growth factor	PDGF
Prostazyklin	PGI ₂
Proteinase K	PK
Sauerstoff	O ₂
Sauerstoffpartialddruck	pO ₂
Stickstoff-Monoxid	NO
Interferon- γ	IFN- γ
Terminal desoxynucleotidyl Transferase	TdT
Transforming growth factor- β	tGF- β
Tumor Nekrose Faktor- α	TNF α
University of Wisconsin	UW

1. Einleitung

1.1 Die Koronarchirurgie gestern und heute

Der erste Einsatz eines extrakorporalen Kreislaufes für die Behandlung eines Vorhofseptumdefekts durch Gibbon (1954) leitete die Epoche der Herzchirurgie ein. Seit der Verwendung eines Vena saphena magna Bypasses (Garrett et al., 1964) und den Arbeiten von Favaloro (Favaloro, 1969) ist die operative Therapie der koronaren Herzkrankheit (KHK) ein wichtiger Bestandteil der Herzchirurgie. Dabei wurde die Anastomosierung des venösen Grafts koronarokoronar und später aortokoronar durchgeführt (Favaloro, 1969). Der erste arterielle Bypassgraft mittels einer Arteria mammaria interna (IMA) wurde 1964 verwendet (Kolessov, 1967).

Heute werden zur Revaskularisation überwiegend autologe venöse und arterielle Grafts verwendet. Als venöse Grafts werden die Vena saphena magna und parva und selten die Vena cephalica verwendet. Neben der IMA werden des Weiteren die

A. gastroepiploica, die A. radialis oder die A. epigastrica als Grafts anastomosiert.

Bei der KHK entstehen Koronarstenosen auf dem Boden arteriosklerotischer Plaques (Davies und Hagen, 1995). Risikofaktoren, die die Entstehung arteriosklerotischer Plaques begünstigen, sind unter anderem der Nikotinabusus, die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, die Hypercholesterinämie, die genetische Disposition und das männliche Geschlecht.

Therapeutische Behandlungsmethoden der KHK beinhalten konservative, operative und interventionelle Ansätze. Im Jahr 2005 wurden insgesamt 67.336 koronarchirurgische Eingriffe in Deutschland durchgeführt (Bruckenberg, 2005).

Im Vergleich zu arteriellen Grafts stellen die hohen Okklusionsraten der verwendeten venösen Grafts ein wesentliches Problem in der Koronarchirurgie dar. Nach 10 Jahren sind 50 % der venösen Grafts okkludiert, während arterielle Bypässe nach 10 Jahren eine Verschlussrate von lediglich 20 % aufweisen (Fitzgibbon et al., 1996).

1.2 Morphologische Unterschiede zwischen Arterien und Venen

Arterielle Blutgefäße lassen drei Wandschichten erkennen. Dabei handelt es sich um die innen liegende, das Lumen abgrenzende Intima, die anschließende Media und die außen liegende Adventitia. Die Intima besteht aus einem einschichtigen Endothel, wobei die Endothelzellen durch „tight junctions“ miteinander verbunden sind. Die Media wird von glatten Muskelzellen gebildet, die innen longitudinal und außen zirkulär ausgerichtet sind. Die Adventitia besteht überwiegend aus Kollagen und Elastin mit den darin enthaltenen Vasa vasorum, sowie aus Fibroblasten und Proteoglykanen.

Im Unterschied zu Arterien lässt sich in Venen neben dem Endothel das Subendothel identifizieren, welches aus Kollagen, Elastin, vereinzelt glatten Muskelzellen und Fibroblasten besteht. Die Endothelzellen der Venen sind größer und flacher als in Arterien. Die „tight junctions“ zwischen Endothelzellen weisen eine höhere Permeabilität als arterielle Endothelzellen auf. Die Media ist in Venen relativ schmal und kann von Kollagen und Elastin durchsetzt sein. Die Adventitia von Venen ist im Vergleich zur Media breiter und besteht zum großen Teil aus kollagenen Bündeln, die von elastischen Filamenten umgeben sind. Im Vergleich zu Arterien enthält die Adventitia von Venen mehr Vasa vasorum, weshalb die intakte Venenwand weniger vulnerabel gegenüber ischämischen Schäden ist (Junqueira und Carneiro, 2003).

Insbesondere Endothelzellen besitzen einen hohen Stellenwert für Gefäße, denn sie kontrollieren den vasomotorischen Tonus, beeinflussen die Blutgerinnung und regulieren die Proliferation vaskulärer Zellen.

Die Endothelzellen von Gefäßen regulieren den vasomotorischen Tonus durch die Synthese vasokonstriktorischer sowie vasodilatatorischer Mediatoren. Wichtige Vasokonstriktoren sind u.a. Serotonin, Angiotensin II und Endothelin-1 (Bryan et al., 1994). Für die Vasodilatation werden vor allem Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) von den Endothelzellen synthetisiert (Davies et al., 1994).

Weitere wichtige Funktionen des NO sind die Induktion der Apoptose in vaskulären Zellen, die Inhibierung der Proliferation glatter Muskelzellen, die Reduktion adhärenter Moleküle auf der Gefäßoberfläche mit konsekutiv verringerter Plättchenaggregation sowie die Inhibierung neutrophiler Granulozyten (Blanco et al., 1995; De Caterina et al., 1995; Moncada et al., 1991; Nakahashi et al., 1995). Des Weiteren werden durch NO

freie Sauerstoffradikale inaktiviert sowie die Freisetzung von Prostaglandin E₂ und F₂ α blockiert (Davies et al., 1994; Shuhaiber et al., 2002).

Durch die Synthese des antikoagulatorischen Proteoglykans Heparinsulfat, welches die Wirkung von Antithrombin III (AT III) potenziert, regulieren die Endothelzellen die intravasale Blutgerinnung. Die vom Endothel synthetisierten Inhibitoren NO und PGI₂ der Plättchenaggregation wirken ebenfalls regulierend auf die Blutgerinnung (Angelini et al., 1989; Cox et al., 1991).

Weiterhin produzieren die Endothelzellen eine Reihe autokriner und parakriner Mediatoren, u.a. den platelet derived growth factor (PDGF), den basic fibroblast growth factor (bFGF) und den epidermal growth factor (EGF), wodurch die Proliferation, die Migration und die Apoptose glatter Muskelzellen reguliert werden (Davies und Hagen, 1993; Ross, 1993).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen des Endothels wird ersichtlich, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen der Endothelzellen für die Graftvaskulopathie von Bedeutung sind (Davies et al., 1994).

1.3 Ursachen der Endothelzellschäden in venösen Grafts und mögliche Vermeidungsstrategien

Endothelzellschäden in venösen Grafts begünstigen sowohl die Induktion der Intimahyperplasie als auch den frühzeitigen thrombotischen Graftverschluss.

Während der Bypassoperation führen die Präparation der venösen Grafts, die Ischämiezeit sowie die Druckerhöhung zur Leckagenkontrolle mittels physiologischer Kochsalzlösung zu signifikanten Endothelzellschäden (Davies und Hagen, 1995). Der operative Eingriff an sich bewirkt einen Anstieg des plasmatischen Fibrinogens, wodurch eine prothrombotische Reaktion gefördert wird (Moor et al., 1994).

Nach Anastomosierung des venösen Grafts unterliegen diese bei arteriellen Druckbedingungen einer Überstreckung und einem zunehmenden tangentialen Stress, wodurch endotheliale Zellschäden entstehen (Cox et al., 1991; Davies et al., 1993).

Die Reperfusion des venösen Grafts mit oxygeniertem Blut initiiert eine vermehrte Akkumulation neutrophiler Granulozyten an hypoxisch geschädigten Endothelzellen (Verrier und Boyle, 1996).

Des Weiteren verursachen adhärenente Moleküle auf der Endotheloberfläche ebenfalls eine Akkumulation neutrophiler Granulozyten, wodurch weitere endotheliale Schäden entstehen mit möglicher Aktivierung der Gerinnungskaskade (Motwani und Topol, 1998; Shreeniwas et al., 1992).

Vermeidungsstrategien zur Reduktion der Endothelzellschäden während der Operation beinhalten den minimalen manuellen und instrumentalen Kontakt mittels der so genannten „no touch“ Technik (Gottlob, 1977), die Verwendung von vasoprotektiven Lösungen (Kurusz et al., 1981) sowie die Leckagenkontrolle mit einem Druck kleiner 100 mmHg (Bush et al., 1984).

Bei der Verwendung venöser Grafts ist zu beachten, dass Venen, die in der sechsten und siebten Lebensdekade in 95 % der Fälle bereits pathologische Veränderungen, u.a. die Phlebosklerose und die Hypertrophie der glatten Muskelzellen, aufweisen (Stanley et al., 1973) zu Stenosen prädisponieren (Wilson et al., 1997). Somit sollten varikös veränderte Venen möglichst nicht als Graft verwendet werden.

Eine postoperativ protektive Wirkung auf venöse Endothelzellen wird bei einer niedrigen Thrombozytenkonzentration, einer geringen Prothrombinzeit und einer verlängerten partiellen Thromboplastinzeit ausgeübt (Shuhaiber et al., 2002). Die medikamentöse Inhibierung der Thrombozytenaggregation reduziert ebenfalls die Graftvaskulopathie. Da die Therapie aber bereits vor der Operation eingeleitet werden sollte, steigt das Risiko für postoperative Nachblutungen (Chesebro et al., 1986).

1.4 Unterschiede zwischen kolloidalen und kristalloiden Lösungen

Neben der Anwendung der „no touch“ Operationstechnik sowie der Leckagenkontrolle des Grafts mit einem Druck kleiner 100 mmHg, ist besonders der Einsatz einer geeigneten Aufbewahrungslösung zur Prävention endothelialer Schäden in venösen Grafts von wesentlicher Bedeutung (Shuhaiber et al., 2002).

Weltweit werden heute sowohl kolloidale als auch kristalloide Lösungen intraoperativ angewendet.

Die kristalloiden Lösungen unterscheiden sich durch ihre Ionenzusammensetzung, wobei die Natriumkonzentration dabei ausschlaggebend ist.

Lösungen mit niedrigen Natriumkonzentrationen werden intrazelluläre Lösung genannt. Die Konzentration in der Lösung entspricht dabei der intrazellulären Natriumkonzentration. Die niedrige Natriumkonzentration soll das unter anaerober Hypothermie entstehende Zellödem durch die Vermeidung eines Natriumeinstromes in die Zelle verhindern. Eine häufig verwendete und oftmals untersuchte intrazelluläre Lösung ist University of Wisconsin (UW) (Drinkwater et al., 1995).

Kristalloide Lösungen mit hohen Natriumkonzentrationen werden dagegen extrazelluläre Lösung genannt. Die Celsiorlösung zählt zu diesem Lösungstyp. Kolloidale Lösungen enthalten im Gegensatz zu kristalloiden Lösungen Blutanteile und kommen in unterschiedlichen Variationen zum Einsatz. Grundsätzlich scheint heparinisiertes Vollblut aufgrund seiner Zusammensetzung optimal für die kurzzeitige Protektion von Grafts zu sein. Jedoch führen die darin enthaltenen Thrombozyten, Leukozyten, das Fibrin und weitere prothrombotische Substanzen zu Graftschädigungen (Shuhaiber et al., 2002).

Kristalloide Lösungen enthalten dagegen keine Blutbestandteile. Dennoch führen sie oft zu ausgedehnten irreparablen Schäden venöser Endothelzellen (Anastasiou et al., 1997). Unter anderem führt die physiologische Kochsalzlösung im Vergleich zur Ringer-Laktat-Lösung zu einer erhöhten Intimaproliferation der Venenwand (Davies und Hagen, 1995). Weiterhin zeigt die Lösung UW im Vergleich zur Euro-Collins Lösung eine signifikant höhere Zellintegrität des vaskulären Endothels (Barner und Fischer, 1990).

Neben den unterschiedlichen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen kann auch die Temperatur einen schädigenden Einfluss auf die Endothelzellen hervorrufen. So zeigt eine Studie, dass in Venen 25 bis 50 % der Endothelzellen verloren gehen, wenn diese in einer 28°C temperierten Kochsalzlösung aufbewahrt werden (Gundry et al., 1980; Solberg et al., 1992). Die Kühlung der Lösung hat durch die Minderung des Zellmetabolismus somit einen protektiven Effekt bezüglich möglicher Endothelzellschäden (Davies und Hagen, 1995).

Die Anforderungen an eine optimierte intraoperative Konservierungslösung sollte vier Forderungen erfüllen: die Prävention eines entstehenden Zellödems, die Limitierung einer Hyperkalzämie der Zellen, Antagonisierung der freien Radikale sowie die Kontrakturprävention aufgrund des Energieverlustes der Zelle.

1.4.1 Die Celsiorlösung

Die in der Arbeit untersuchte Celsiorlösung wurde bisher erfolgreich als universelle Aufbewahrungslösung für alle intrathorakalen Organe verwendet (Menasche et al., 1994). Unter anderem wurde es für die längere Preservation von Herztransplantaten entwickelt (Perrault et al., 2001). Es handelt sich um eine hypertone, extrazelluläre Lösung mit einer niedrigen Viskosität, die sowohl die generellen Prinzipien von Aufbewahrungslösungen als auch spezifische Aspekte für die Preservation von Herzgewebe in sich vereint (Cavallari et al., 2002).

Insbesondere die Prävention vor ischämischen Kontrakturen und Dysfunktionen bis hin zur Vermeidung eines entstehenden Zellödems gehören zu diesen Aspekten. Die hohe antioxidative Kapazität sowie der potente Schutz der Zellen vor dem entstehenden Zellödem sind Charakteristika der Celsiorlösung. Insbesondere die hohe Konzentration an reduziertem Glutathion bewirkt eine effektive Prävention der myokardialen Funktionen gegenüber entstehenden freien Radikalen, die während der Ischämiephase sowie während der Reperfusion entstehen (Perrault et al., 2005). Myokardiale Zellen werden durch Mannitol und Laktobionat in der Lösung vor dem drohenden Zellödem geschützt (Carrier et al., 1999). In vorausgegangenen Studien zeigte sich ebenfalls eine gute Protektion der koronaren, endothelialen Funktion im Vergleich zu standard-kristalloiden und den auf Blut basierenden Lösungen (Perrault et al., 2005).

Aufgrund der Literaturdaten bzgl. der Prävention kardialer Endothelzellen durch die Celsiorlösung wurde diese Lösung für die Studie ausgesucht.

1.5 Verschlussraten arterieller und venöser Grafts

Wie bereits erwähnt, weisen venöse Grafts im Vergleich zu arteriellen in Kurz- und Langzeitbeobachtungen höhere Verschlussraten auf (Dilley et al., 1988).

Die Verschlussrate in venösen Grafts liegt im ersten postoperativen Jahr zwischen 15 % und 26 %. Bis zum sechsten postoperativen Jahr beträgt die anschließende jährliche Steigerungsrate 1-2 %. Ab dem siebten postoperativen Jahr zeigt sich eine jährliche Steigerungsrate von 4 %. Nach 10 Jahren sind 50 % der venösen Grafts okkludiert. In den übrigen nicht okkludierten Grafts weisen wiederum nur 50 % der Grafts keine signifikanten Stenosen auf (Fitzgibbon et al., 1996).

Im Gegensatz dazu weisen nur 20 % der arteriellen Grafts nach 10 Jahren signifikante Stenosen auf (Fitzgibbon et al., 1996). Die zugrunde liegenden pathologischen Veränderungen der venösen Grafts unter arteriellen Druckbedingungen werden in drei zeitliche Kategorien eingeteilt:

- a) Die Thrombose, die innerhalb des ersten postoperativen Monats auftritt.
- b) Die Intimahyperplasie, die zwischen dem 2. und 24. postoperativen Monat auftritt.
- c) Die Arteriosklerose mit Beginn ab dem 2. postoperativen Jahr (Davies und Hagen, 1995).

1.5.1 Thrombose

Innerhalb des ersten postoperativen Monats weisen zwischen 3 und 12 % der venösen Grafts thrombotische Verschlüsse auf (Bourassa, 1991). Im Unterschied zu Arterien sind die antikoagulatorischen Eigenschaften der Venenwand eher gering ausgeprägt (Motwani und Topol, 1998). Die Konzentrationen von NO, PGI₂ und Heparinsulfat sind in Venen niedriger als in Arterien (Angelini et al., 1989; Cox et al., 1991).

Der zusätzlich während der Operation entstehende Endothelzellschaden führt zur Akkumulation von Fibrin auf der Endotheloberfläche, zur Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sowie zu einer reduzierten Produktion von Gewebsplasminogenaktivator (tPA) (Dilley et al., 1992; Verrier et al., 1996). Darüber

hinaus wird durch die Freilegung des subendothelialen Gewebes die extrinsische Gerinnung aktiviert (Nachman et al., 1993).

Des Weiteren induzieren erhöhte Flussraten in venösen Grafts die Thrombozytenadhäsion an der Endotheloberfläche. Abhängig vom Ausmaß des Endothelzellschadens mit konsekutiv erhöhter Thrombozytenaggregation steigt das Risiko einer Thrombusbildung (Faulkner et al., 1975; Spray et al., 1977).

Daneben begünstigen auch erniedrigte Flussraten in venösen Grafts mit resultierender relativer Blutstase die Thrombusbildung. Eine erniedrigte Flussrate entsteht durch Anastomosenstrikturen oder die Anastomisierung des Grafts vor einem weiteren atheromatösen Segment. Die hohe Sensibilität venöser Grafts mit denaturiertem Endothel gegenüber zirkulierenden Vasokonstriktoren, vor allem gegenüber Endothelin-1, bewirkt ebenfalls eine erniedrigte Flussrate bis hin zur Stase (Motwani und Topol, 1998; te Velthuis et al., 1996). In 73 % aller venöser Grafts sind in den ersten 24 postoperativen Stunden murale oder okklusive Thromben nachweisbar, wobei die Organisation eines muralen Thrombus eine Ursache für die Intimahyperplasie in venösen Grafts darstellt (Angelini et al., 1990).

1.5.2 Intimahyperplasie

Die Intimahyperplasie, definiert als Akkumulation und Proliferation glatter Muskelzellen, ist die bedeutendste pathologische Veränderung in venösen Grafts zwischen dem ersten postoperativen Monat und dem zweiten postoperativen Jahr (Motwani und Topol, 1998).

Die Ischämiephase während der Preservation venöser Grafts erhöht die Konzentration von freien Radikalen, die die Proliferation von glatten Muskelzellen induzieren (Motwani und Topol, 1998; Rao und Berk, 1992).

In den ersten 72 postoperativen Stunden entsteht unter arteriellen Druckbedingungen ein Endothelzellverlust oder –schaden mit daraus resultierender Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima und der anschließend einsetzenden Proliferation (Davies und Hagen, 1995; Motwani und Topol, 1998).

Zwischen dem 7. und 14. postoperativen Tag steigt die Proliferationsrate weiter an und normalisiert sich wieder ab der 12. Woche (Davies und Hagen, 1995).

Die Organisation nichtokklusiver, muraler Thromben induziert ebenfalls eine Proliferation von glatten Muskelzellen in venösen Grafts (Verrier et al., 1996; Yang et al., 1997).

Nach ca. 2 Wochen ist das Subendothel venöser Grafts wieder reendothelialisiert. Aufgrund der fortlaufenden Intimahyperplasie nach abgeschlossener

Reendothelialisierung beeinflussen nun weitere Faktoren, unabhängig vom Endothelschaden, die Intimahyperplasie (Cox et al., 1991; Dilley et al., 1992). Unter anderem verursachen die arteriellen Druckbedingungen eine hohe Druckbelastung der Gefäßwand mit einer vermehrten Expression von bFGF-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der Intima mit konsekutiver Steigerung der Proliferation (Nguyen et al., 1994). Des Weiteren induzieren geringere Scherkräfte bei reduzierten Flussraten eine vermehrte Produktion von PDGF, bFGF und Endothelin-1 und reduzieren die Synthese von Wachstumsinhibitoren, wie den transforming growth factor- β (tGF- β) und NO (Allaire et al., 1997; Cox et al., 1991). Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zwischen wachstumsinduzierenden und -inhibierenden Faktoren zugunsten einer verstärkten Proliferation. Operative Manipulationen an den Vasa vasorum induzieren ebenfalls ischämische Zellschäden an glatten Muskelzellen mit einer anschließend einsetzenden Proliferation vitaler glatter Muskelzellen (Cox et al., 1991).

Die Intimahyperplasie in venösen Grafts induziert letztendlich die Bildung arteriosklerotischer Plaques (Stary et al., 1992).

1.5.3 Arteriosklerose

Nach dem zweiten postoperativen Jahr stellt die Arteriosklerose die Hauptursache für die „späten“ Graftschäden dar, wobei erste arteriosklerotische Läsionen bereits in den ersten 3 bis 6 Monaten nach Revaskularisation auftreten (Lüscher et al., 1991).

Bei venösen Grafts wird aufgrund der Beschleunigung arteriosklerotischer Veränderungen von „beschleunigter Arteriosklerose“ gesprochen, im Gegensatz zur „spontanen Form“ bei arteriellen Gefäßen (Ip JH et al., 1990).

Der Unterschied zwischen der Graftvaskulopathie und der Arteriosklerose zeigt sich histologisch in einer diffusen Verteilung der Läsionen, einer konzentrischen Anordnung sowie durch eine schwach ausgebildete oder fehlende fibröse Kappe. Des Weiteren finden sich in den Läsionen venöser Grafts vermehrt Makrophagen, T-Lymphozyten sowie Lipidablagerungen (Hansson GK et al., 1991; Ratkliff und Myles, 1989). Die Balance zwischen der Proliferation und der Apoptose glatter Muskelzellen in Graftläsionen beeinflusst den weiteren Verlauf der arteriosklerotischen Graftvaskulopathie (Best et al., 1999).

Faktoren, die die Apoptose glatter Muskelzellen inhibieren und dadurch die Proliferation glatter Muskelzellen induzieren, sind Angiotensin II, IGF-1, bFGF und PDGF (Fox et al., 1996; Pollman et al., 1996). Dagegen produzieren Makrophagen u.a. den Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) sowie Interleukin-1 β (IL-1). Die T-Lymphozyten produzieren Interferon- γ (IFN- γ). Eine Kombination der einzelnen Faktoren kann die Apoptose über Rezeptorbindungen an glatten Muskelzellen induzieren (Geng et al., 1996). Des Weiteren exprimieren neben Endothelzellen auch glatte Muskelzellen auf deren Oberfläche unterschiedliche Rezeptoren, über deren Aktivierung die Apoptose induziert wird (Bennett et al., 1998). Die Synthese von NO durch die Endothelzellen bewirkt ebenfalls die Apoptose in glatten Muskelzellen (Pollman et al., 1996). Ein Konzentrationsabfall von IGF-1 und PDGF steigert ebenfalls die Apoptoserate glatter Muskelzellen in tieferen Schichten arteriosklerotischer Läsionen (Bennett et al., 1998). Die Induktion der Apoptose in glatten Muskelzellen insbesondere durch Makrophagen und T-Lymphozyten führt zur möglichen Ruptur arteriosklerotischer Plaques mit konsekutivem thrombotischen Graftverschluss (Motwani und Topol, 1998). Da glatte Muskelzellen wichtige Strukturproteine in Form von Kollagen I und III synthetisieren, scheint eine erhöhte Apoptoserate glatter Muskelzellen prädisponierend für eine Plaque-ruptur zu sein (Boyle JJ, 1999). In der Tat werden vermehrt apoptotische glatte Muskelzellen in rupturierten Plaqueläsionen im Vergleich zu nicht rupturierten Plaques detektiert (Bauriedel et al., 1997).

1.5.4 Die Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der durch aktive Regulationsprozesse erfolgt und für die Elimination von Zellen sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase verantwortlich ist. Der apoptotische Zelltod wurde 1965 erstmals von Kerr beschrieben (Kerr, 1965). Der apoptotisch regulierte Zelltod darf dabei nicht mit dem nekrotischen Zelltod verwechselt werden. Morphologische Auffälligkeiten der Apoptose sind u.a. ein Volumenverlust der Zelle, die Kondensation des Chromatins, intakte Organellen und Zellmembranen sowie die Bildung sogenannter apoptotic bodies. Von großer Bedeutung ist dabei die strukturelle Veränderung der Zellmembran, da hierdurch eine inflammatorische Reaktion, anders als bei der Nekrose, vermieden wird. Am Ende stirbt die Zelle ohne begleitende Umgebungsreaktion ab, da die Zelle den Kontakt zu den Nachbarzellen verliert. Dadurch wird die Freisetzung zellschädigender Substanzen im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod vermieden, weshalb keine Entzündungsreaktion auftritt.

Die Induktion der Apoptose kann durch eine Reihe von exogenen und endogenen Stimuli eingeleitet werden. Dazu gehören u.a. Hitze, freie Radikale, Toxine, UV- und Röntgenstrahlung, Zytostatika, Glukokortikosteroide oder die Aktivierung des Fas-Systems etc. (Thompson CB, 1995). Es können sowohl rezeptorfremde als auch rezeptorgebundene Signalwege eingeleitet werden, in beiden Fällen stellt die Aktivierung der Caspasen-Kaskade das gemeinsame Ziel dar (Kerr et al., 1972).

Zwei verschiedene Wege der Apoptoseinduktion können vorliegen, wobei eine strenge Trennung nicht immer vorhanden ist. Beim extrinsischen Weg wird ein extrazelluläres Signal an einen Rezeptor gebunden und anschließend über die Zellmembran nach intrazellulär weitergeleitet. Als besonders wichtiges Molekül hat sich der Fas-Ligand mit seinem Fas-Rezeptor erwiesen, da dieser in fast jeder Zelle nachweisbar ist (Dibbert und Simon, 1997). Daneben stellt auch der TNF mit dem TNF-1 Rezeptor einen wichtigen Auslöser des extrinsischen Weges dar. Nach Aktivierung der Rezeptoren werden mehrere biochemische Reaktionen gestartet, an deren Ende die Aktivierung einer Proteasen-Kaskade steht.

Beim intrinsischen Weg wird unabhängig von Rezeptoren mitochondriales AIF und Cytochrom C freigesetzt. Zusammen mit Apaf-1 und der Procaspase 9 bildet sich

hieraus ein Apoptosom, welches die Caspase 9 aktiviert und somit ebenfalls die Kaskade aktiviert. Die Aktivierung der Caspasen spielt eine zentrale Rolle im apoptotischen Signalweg (Zhu et al., 1995). Die einzelnen Caspasen zeigen unterschiedliche Funktionen. Sie können sich untereinander aktivieren und inhibieren. Des Weiteren lysieren Caspasen intrazelluläre Enzyme, DNA-Strukturen, Strukturproteine und Bestandteile des Zellgerüsts. Zur Inhibierung der Initiator- und Effektorcaspasen stehen eine Reihe von inhibitorischen Proteinen zur Verfügung, die sowohl Procaspasen als auch bereits aktivierte Caspasen inhibieren und somit die Apoptose regulieren.

Des Weiteren stehen zur Regulation der Apoptose bestimmte Gene zur Verfügung. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Familie der Bcl-2-Proteine, die eine Apoptoseinduktion hemmen und die Familie der Bax-Proteine, die eine Apoptoseinduktion durch Hemmung von Bcl-2 fördern (Steller H, 1995). Daneben überprüft das Tumorsuppressorgen p53, inwieweit die DNA intakt ist und löst bei irreparablen Schäden die Apoptose aus.

1.6 Ziele der Arbeit

Aufgrund der bisher guten Ergebnisse der Celsiorlösung bei der Reduktion von Endothelschäden in längeren Beobachtungszeiträumen untersuchen wir, inwieweit Celsior die frühen Zelltodereignisse bei ischämischen und hypothermen Bedingungen zwischen Explantation und Implantation in venösen Grafts verhindern kann, um die anschließende Graftvaskulopathie zu minimieren. Des Weiteren wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch die Oxygenierung der Celsiorlösung weitere Endothelzellschäden vermieden werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Die Versuchslösung Celsior

Die für die Arbeit zu untersuchende Lösung Celsior wird von der Firma Imtix Sangstat, Lyon, Frankreich, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Fertiglösung mit einer Osmolarität von 320 mosmol/kg und einem pH-Wert von 7,30. Das vom Hersteller empfohlene Temperaturoptimum von Celsior liegt zwischen 2° C und 8° C. Folgende Einzelkomponenten sind in Celsior enthalten:

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösung Celsior

Inhaltskomponente	Gewicht (g)	Konzentration (mmol)
Mannitol	10,93	60
Lactobionat	28,664	80
Glutamatsäure	2,942	20
Natriumlauge	4,0	100
Calcium-Chlorid (2H ₂ O)	0,037	0,25
Kaliumchlorid	1,118	15
Magnesiumchlorid (6H ₂ O)	2,642	13
Histidin	4,65	30
Glutathion	0,921	3
Ad 1000 ml aqua dest.		

2.2 Chemikalien und Zusatzlösungen für den TUNEL-Test

TUNEL-Kit

Zur Detektion der apoptotischen Zellkerne wird das TUNEL-Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, verwendet: In situ Cell Death AP = TUNEL + Converter-AP. Anschließend eindeckeln mit Aquatex[®].

Weitere Chemikalien und Zusatzlösungen, die für die Durchführung des TUNEL-Test notwendig sind, werden von den Firmen Boehringer Mannheim, Mannheim, Biochrom AG, Berlin, Biozol, Eching, KMF, Sankt Augustin und Roche Diagnostics, Mannheim, bezogen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der einzelnen Lösungen für den TUNEL-Test

Lösungen	Zusammensetzung
Proteinase K	10 µl Proteinase K + 990 µl Tris; davon 100 µl + 900 µl Tris.
FCS (fetales Kälber Serum) (Biochrom)	100 µl FCS + 2400 µl PBS
Fast Red Substratpuffer (Biozol)	Fertig angesetzt
Fast Red Tabletten (Biozol)	1 Tablette Fast Red in 5 ml Puffer gelöst
Hämalaun (KMF)	Hämalaun nach Mayer fertig angesetzt

2.3 Chemikalien und Zusatzlösungen für die H.E. Färbung

Chemikalien und Zusatzlösungen für die Hämatoxylin-Eosin Färbung werden von der Firma Merck KG Pharma, Darmstadt verwendet: Plasmafärbung Eosin-G-Lösung (Merck), 0,5 % wässrig

Tabelle 3: Zusammensetzung Kernfarbe Hämatoxylin nach Mayer

Hämatoxylin	1 g Hämatoxylin (kristallin)
Künstliches Reifungsmittel	0,2 g NaJo ₃
Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat	50 g Kalialau, 50 g Chloralhydrat
Monohydrat	1 g Zitronensäure
ad 1000 ml aqua dest.	

Anschließend Eindeckeln mit Entellan[®] (Merck)

2.4 Geräte und sonstige Materialien

Folgende Geräte und Materialien werden ebenfalls zur Durchführung des Experiments benötigt:

Tabelle 4: Eingesetzte Geräte zur Durchführung der Arbeit

Geräte	Firma
Analysesoftware analySIS [®] 3.0	Soft Imaging System GmbH, Münster
BGA-Analysator ABL 505 OSM 3 Hemoximeter	Diamond Diagnostics, Holliston, MA,USA
Digitalkamera CAMEDIA-C3030 ZOOM	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Inkubator Heraeus-B6030	Kendro Laboratory Products, Hanau
Mikroskop BX41 System-Mikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Schlittenmikrotom SM 2000R	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Thermometer Precision ama-digit	Greiner Glasinstrumente GmbH, Lemgo
Wasserstreckbad HI 1210	Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Tabelle 5: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Deckgläser Supe Rior	Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen
Einbettkassetten Rotilabo [®]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Tuttingen
Einmalskalpelle Cutfix [®] , Größe 11	Aesculap AG + Co. KG, Karlsruhe
Einmalspritzen Terumo Syringe, 1 ml	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Mikrotomklingen Typ C 35	Feather Safety Razor Co., Köln
Pipetten Eppendorf - Research [®]	Eppendorf GmbH, Hamburg

Folgende Chemikalien und Lösungen werden in der vorliegenden Arbeit angewendet:

Tabelle 6: Allgemein verwendete Chemikalien

Allgemeine Chemikalien	Firma
Isopropylalkohol	Merck KG, Darmstadt
Aqua destillata Seradest Formula 2000	Labomedic, Bonn
Formaldehyd Roti [®] -Histofix 4%, ph 7,0	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Glutaraldehyd Sigma, 25% Aqueous Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol Isomere, 98 %	Carl Roth GmbH +Co., Karlsruhe

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
TRIS-Stammlösung pH 7,6	6,1g Tris-Base + 50 ml aqua dest.; 37 ml 1 N HCl + 1000 ml aqua dest.
TRIS-Puffer pH 7,4-7,6	4,0 g NaCl; 50 ml Tris-Stammlösung (pH 7,6) + 500 ml aqua dest.
PBS-Puffer pH 7,2-7,4	8,5 g NaCl + 1,27 g NaH ₂ PO ₄ + 0,39 g NaH ₂ PO ₄ + 1000 ml aqua dest.
Converter-AP/Magermilchpuffer (1:1)	3,03 g Tris + 2,19 g NaCl + 2,5 g Milchpulver + 250 ml aqua dest. 500 µl Magermilchpuffer + 500 µl Converter-AP

2.5 Versuchsaufbau

Der Arbeitsplatz für die Versuchsdurchführung befindet sich im Arbeitsraum der kardiochirurgischen Technikabteilung direkt neben dem Operationssaal. Für die optimale Durchführung des Versuches muss der Arbeitsplatz verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Eine lückenlose Kühlkette der Graftproben vom Operationssaal bis zum Labor muss gewährleistet sein. Dafür wird die Celsiorlösung in Plastikbecher gefüllt und in eine mit Eiswasser gefüllte Styroporbox eingebracht. Darüber hinaus befindet sich am Arbeitsplatz ein auf 4°C regulierter Kühlschrank, der

zur Aufbewahrung der in Formalin fixierten Venenproben dient. Des Weiteren befindet sich am Arbeitsplatz ein in der Wand integrierter Sauerstoffanschluss, der eine geregelte Sauerstoffzufuhr gewährleistet.

2.6 Versuchsdurchführung

Vor Beginn der Versuchsdurchführung wird der Arbeitsplatz hergerichtet. Der Operateur legt die Vena saphena magna frei und ligiert alle zufließenden Seitenäste. Nach vollständiger Freilegung der Vene bestimmt der Operateur die Länge des Präparates, die für die anschließende koronare Revaskularisation benötigt wird. Die Vene wird anschließend vom Blutfluss abgeklemmt, mit einem Skalpell abgetrennt und mit 0,9 % Kochsalzlösung durchgespült. Damit werden die ligierten Seitenäste auf Leckagen überprüft.

Für die experimentelle Verwendung der nicht zur Revaskularisation verwendeten Venenreste lag die Zustimmung der Patienten vor. Für den Versuch wird lediglich das verbliebene Venensegment, das ansonsten als biologisches Restmaterial verworfen würde, verwendet.

Nachdem der Operateur die Versuchsprobe entnommen und in die Celsiorlösung eingebracht hat wird am Arbeitsplatz der abgeklemmte Bereich der Vene mit einem Skalpell abgetrennt. Zur Bestimmung des Apoptoseindex in den einzelnen Venenschichten zum Zeitpunkt 0 wird die erste Probe der Vene abgeschnitten, in eine Einbettkassette gegeben und in 4°C kühlem Formalin fixiert.

Das Lumen der Vene muss erhalten bleiben, damit beim Auswerten eine genaue Identifizierung und Zuordnung der einzelnen Venenschichten zueinander möglich ist. Beim Eintauchen der Kassette in Formalin dürfen keine Luftblasen verbleiben, die einen aeroben Stoffwechsel der Venenwand aufrechterhalten würden. Das restliche Venenstück wird halbiert. Beim Schneiden mit dem Skalpell ist darauf zu achten, dass beim Fixieren mit der Pinzette keine hohen Kompressionsdrücke auf die Venenwand ausgeübt werden. Zudem müssen Reißbewegungen beim Schneiden vermieden werden. So können keine Barotraumen entstehen, die eine iatrogen induzierte Apoptose begünstigen würden. Die eine Venenhälfte wird nun in die nicht oxygenierte

Celsiorlösung und die andere Hälfte in die oxygenierte Celsiorlösung gegeben. Dieser Zeitpunkt wird notiert, und die Stoppuhr wird gestartet.

Die Celsiorlösung soll laut Angaben des Herstellers eine Temperatur zwischen 2°C und 8°C sowie einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 aufweisen, damit eine optimale Preservation der Venenprobe sichergestellt werden kann. Darüber hinaus soll der Sauerstoffpartialdruck der angereicherten Lösung mindestens über 500 mmHg liegen, um eine Sauerstoffsättigung von 100% zu erhalten. Diese Parameter werden jeweils nach Probenentnahme zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten gemessen und tabellarisch dokumentiert. Mit Hilfe des elektronischen Thermometers wird die Temperatur der Celsiorlösung gemessen. Mit einer Einmalspritze wird anschließend eine 1ml-Probe der oxygenierten Celsiorlösung entnommen und in den Blutgasanalysator eingebracht und somit der Sauerstoffpartialdruck sowie der pH-Wert überprüft.

Nach 15 Minuten werden aus der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung die Venenproben nacheinander herausgeholt und jeweils das zweite Venenstück mit dem Skalpell abgetrennt, in eine beschriftete Einbettkassette gelegt und in Formalin fixiert. Sofort werden die Reststücke in ihre jeweilige Lösung zurückgelegt. Im Anschluss daran werden erneut die drei Parameter Temperatur, pO_2 sowie pH-Wert bestimmt und dokumentiert. Diese Arbeitsschritte werden zu den Zeitpunkten 30, 45, 60 und 90 Minuten wiederholt. Nach dem letzten Arbeitsschritt werden die in Formalin fixierten Venenproben zügig in der mit Eiswasser gefüllten Styroporbox ins Labor transportiert und dort in einen auf 4°C regulierten Kühlschrank für mindestens 48 Stunden aufbewahrt.

2.7 TUNEL-Assay (TdT = terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

Eine in der Literatur weit verbreitete Methode zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von apoptotischen Zellvorgängen besteht in dem TUNEL-Assay. Das Prinzip beruht auf der in-vitro-Markierung der DNA-Fragmente, die während der Apoptose beim Abbau der DNA durch Endonukleasen entstehen (Compton, 1992).

Für die lichtmikroskopische Auswertung werden die freien 3'-OH Enden der DNA mit an Biotin gekoppelten Nukleotiden markiert. Generell stellt der TUNEL-Assay ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Apoptose dar. Teilweise ist diese Methode anderen Methoden bei der Detektion apoptotischer Zellen in frühen Beobachtungszeiträumen überlegen. Auch im Vergleich zur „in situ nick Translation“ mit Gebrauch von DNA-Polymerase wird der TUNEL-Assay als sensitivere und spezifischere Methode angesehen (Gavrieli et al., 1992).

Sie birgt jedoch auch Nachteile. Da der Test aus mehreren Einzelschritten aufgebaut ist, besteht die Möglichkeit der Entstehung von Fehlerquellen in der Durchführung des Tests. Dies birgt die Gefahr von Zellverlusten. Die Spezifität wird durch Einflussfaktoren begrenzt, die zu unvermeidlichen DNA-Strangbrüchen führen. Unter anderem zählen dazu DNA-Rekombinationen, DNA-Replikationen und DNA-Reparaturen (Eastman und Barry, 1992). Dadurch können auch vitale Zellen TUNEL-positiv markiert werden, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden. In der Literatur sind auch atypische Apoptoseabläufe beschrieben worden, die nicht zu einer DNA-Fragmentierung führen (Zamai et al., 1996). Dennoch ist der TUNEL-Assay eine spezifische Methode zum Nachweis apoptotischer Zellen, da diese Zellen einen höheren Gehalt an DNA-Fragmenten aufweisen. Insbesondere überwiegen deutlich doppelsträngige DNA-Fragmente (Ansari et al., 1993). Des Weiteren ist beschrieben worden, dass neben apoptotischen Zellen auch onkotische Zellen zu einem positiven TUNEL-Ergebnis führen können (Kockx et al., 1998; Levin et al., 1995; Trump et al., 1997). Die DNA-Strangbrüche, die bei der onkotischen Nekrose durch unspezifische Degradation entstehen, treten aber erst zu einem späteren Zeitpunkt auf, der bereits morphologisch erkennbar ist (Labat-Moluer et al., 1998; Collins et al., 1992).

Insgesamt ist die TUNEL-Methode vorteilhaft gegenüber einer rein lichtmikroskopischen Untersuchung aufgrund einer leichteren Quantifizierbarkeit, insbesondere bei der Anwendung automatisierter Zählsysteme und erleichtert die Detektion apoptotischer Zellen, die lichtmikroskopisch oftmals unauffällig erscheinen (Ansari et al., 1993; Gavrieli et al., 1992; Levin et al., 1995; Wijsman et al., 1993).

Um falsch positive TUNEL-markierte Zellen zu vermeiden, ist eine sorgfältige Auswahl der Konzentrationen des TdT-Enzyms sowie des proteolytischen Enzyms (Proteinkinase K) zu beachten (Kockx et al., 1998; Wijsman et al., 1993).

2.7.1 Durchführung des TUNEL-Assay

Bei der Apoptose von Zellen entstehen Fragmente der DNA mit definierter Größe, bedingt durch enzymatische Reaktionen. Diese Einzelstrangbrüche können mittels des TUNEL-Assays sichtbar gemacht werden. Dazu werden die freien 3'-OH Enden der DNA mit einem fluoreszierenden Farbstoff mit Hilfe des Enzyms Terminale desoxynukleotidyl Transferase markiert.

Die im Herz-OP entnommenen Venenproben werden nach 48-stündiger Fixierung in 4% gepufferten Formaldehyd bei 4°C im Pathologischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn mittels Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Von diesen eingebetteten Venenproben werden von jedem Patienten jeweils 5 histologische Schnitte mit der Schnittdicke 2 µm zum Zeitpunkt 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten angefertigt und auf beschriftete Objektträger aufgebracht. Anschließend werden die Gewebsschnitte im Inkubator bei 52° C zum Trocknen über mindestens 48 Stunden aufbewahrt.

Nun kann der TUNEL-Test durchgeführt werden. Zur Durchführung des TUNEL-Testes müssen die Gewebeproben zuerst entparaffiniert werden.

Dies geschieht, indem die Objektträger mit den Proben 3-mal in Xylol für jeweils 7 Minuten eingebracht werden. Im Anschluss daran folgt eine absteigende Alkoholreihe. Die Objektträger werden 3-mal in 100%igen Alkohol für jeweils 5 Minuten und in 96%igen, 90%igen und 70%igen Alkohol, jeweils 2-mal für 5 Minuten, eingebracht. Abschließend werden die Objektträger 2-mal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Die entparaffinierten Schnitte können nun dem TUNEL-Test zugeführt werden. Hierfür müssen zuerst die einzelnen Lösungen sowie die notwendigen Puffer mit den entsprechenden Inhaltsstoffen und Konzentrationen sowie dem korrekt eingestellten pH-Wert angesetzt werden. Außerdem wird jeder Gewebsschnitt mit einem Diamantstift umkreist und die Negativkontrolle markiert.

Der eigentliche TUNEL-Test verläuft anschließend in mehreren Arbeitsschritten. Zuerst muss das Gewebe proteolysiert werden. Dafür wird Proteinase K (PK) in der Konzentration 14-22 mg/ml in 10mM Tris-HCL mit einem pH-Wert von 7,5 in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Gewebeproben mit einer Eppendorf-Pipette aufgebracht und 30 Minuten bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wird mit PBS 2-mal für 5 Minuten gespült. Anschließend wird die Probe mit FCS der Firma Biochrom in einer Verdünnung von 1:25 für 30 Minuten bei Raumtemperatur der feuchten Kammer ausgesetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Das FCS wird danach abgeklopft. Die aufgetauten TUNEL-Reagenzien werden unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt, indem man 100 µl der Marker-Lösung (= Nucleotid-Mix in Puffer) für die Negativ-Kontrolle entnimmt und den Rest dann der Enzymlösung (Terminale desoxynucleotidyl Transferase aus Kälberthymus in Puffer) beimischt. Nachfolgend wird kurz vorgetextet, an zentrifugiert und dieses sofort aufgetragen.

Die Präparate werden 10 Minuten lang bei 37° C in der feuchten Kammer inkubiert. Auf die Negativ-Kontrollen wird nur der Marker, kein Enzym, aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle läuft entweder eine bereits positiv-bekannt Probe oder ein Thymuspräparat mit. Danach wird erneut 2-mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wird das Converter-AP/Magermilchpulver-Puffer-Gemisch in einem Verhältnis von 1:1 aufgetragen und bei 37° C in der feuchten Kammer 30 Minuten lang aufbewahrt. Hierbei werden die fluorescein-markierten DNA-Stränge an einen Anti-Fluorescein-markierten und an AP (Alkalische Phosphatase) konjugierten Antikörper gebunden, so dass diese mit dem Substrat im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Danach erfolgt das erneute Spülen mit PBS, wie oben beschrieben. Das im Dunkeln gelöste Fast Red (=Substrat) wird nun aufgetragen, und man lässt es bei Raumtemperatur 30 Minuten lang im Dunkeln auf die Probe einwirken. Anschließend wird die Probe 6 Minuten lang mit destilliertem Wasser gewässert.

Zum Schluss erfolgt die Kern-Gegenfärbung mit Mayer`s Hämalaun für 7 Sekunden, wobei sich der Farbstoff durch das Spülen mit fließendem, lauwarmem Leitungswasser für 5 - 10 Minuten entwickelt. Danach können die Proben auf die Objektträger mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel, z.B. Aquatex[®], eingedeckelt und anschließend unter dem Lichtmikroskop begutachtet und ausgewertet werden. Die Negativ-Kontrolle darf nur lila gefärbte Zellkerne beinhalten. Positiv ausfallende Gewebeschnitte zeigen um den

pygnotischen Kern ein rotes Signal. Die Positiv-Kontrolle muss auf jeden Fall positiv-markierte Zellen beinhalten.

2.8 Durchführung der H. E.-Färbung

Die Schnitte der Gewebeproben werden, analog zum TUNEL-Test, in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe mit den gleichen Prozentwerten entparaffiniert. Nach dem Spülen mit Aqua dest. werden die Objektträger für die Kernfärbung in die angesetzte Hämatoxylinlösung 5 Minuten lang eingetaucht. Danach werden die Objektträger mit fließend warmem Wasser 5 Minuten lang abgespült. Anschließend erfolgt die Plasmafärbung mittels Eosin-G-Lösung, wobei die Objektträger für 1-2 Minuten in die Eosinlösung eingetaucht werden. Zum Differenzieren werden nun die Objektträger 3-6-mal in 70%igen Alkohol eingetaucht. Es erfolgt das erneute 3-6 malige Eintauchen in 90%igen Alkohol. Anschließend werden die Objektträger nochmals zum Entwässern in die absteigende Alkoholreihe nacheinander für jeweils 2 mal 5 Minuten eingetaucht und zum Schluss erfolgt nochmals ein dreimaliges Eintauchen in Xylol für jeweils 7 Minuten. Damit können die Objektträger mit Entellan[®] eingedeckelt werden und im Anschluss unter dem Mikroskop beurteilt werden.

2.9 Bestimmung der Morphologie

Zur Bestimmung der Morphologie der Vena saphena magna Proben werden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeproben unter dem Mikroskop beurteilt. Dabei wird zuerst überprüft, ob die Gewebeproben auf allen Objektträgern intakt geblieben sind und nicht durch die diversen Arbeitsschritte beim Schneiden und beim Färben beschädigt wurden. Hauptkriterium ist das intakte Lumen der Vene.

Das Hauptaugenmerk wird dabei auf ein intaktes, zusammenhängendes Endothel gelegt, da dieses sehr sensibel auf äußere Manipulationen reagiert. Weiterhin wird überprüft, ob die histologische Abgrenzung der einzelnen Schichten zueinander möglich ist. Schließlich wird die Morphologie der Zellen beurteilt. Dabei wird zwischen Zellen

unterschieden, die morphologische Kriterien einer Nekrose und Kriterien einer Apoptose aufweisen.

Zu den morphologischen Kriterien der Nekrose zählen das Zellödem, ein homogener und milchglasartiger Aspekt sowie zytoplasmatische Vakuolen. Dagegen weisen die Zellen mit apoptotischen Veränderungen morphologische Kriterien auf wie Zellschrumpfung, Kondensation zytoplasmatischer Proteine, Auffaltung der Zellmembran ("membran blebbing") und "apoptotic bodies". Damit wird überprüft, ob die gewonnenen Gewebeproben die technischen Voraussetzungen für die Auswertung erfüllen.

2.10 Auswertung mit der Software analySIS® 3.0

Die histologischen Schnitte der gewonnenen Vena saphena magna Präparate werden nach der immunhistochemischen TUNEL-Färbung mit Hilfe der Software analySIS® 3.0 systematisch beurteilt und ausgewertet. Zuerst werden von den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten der 30 Patientenproben jeweils 5 Gesichtsfelder mit der Digitalkamera CAMEDIA-C3030 ZOOM in Ultra Hoher Qualität (UHQ) fotografiert und mittels USB-Kabel an den Computer übermittelt. Anschließend wird mit der Software analySIS® 3.0 die Bildbearbeitung vorgenommen (siehe Anhang).

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung wird mit der Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Dafür wurde die Software SPSS Version 12.0.1 verwendet.

Es werden zum einen Innersubjektfaktoren (jeweilige Messgröße im Zeitverlauf) und zum anderen Zwischensubjektfaktoren (Gruppen) betrachtet. Mit der Bezeichnung „Gruppe“ wird die Zugehörigkeit der Grafts zur Gruppe „mit Sauerstoff“ und „ohne Sauerstoff“ festgelegt. Der Zeiteinfluss bezieht sich auf den Verlauf der Apoptoseraten mit der Zeit.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt werden für die vorliegende Arbeit 30 Venengrafts von unterschiedlichen Patienten in den Versuch aufgenommen, wovon 70 % der venösen Grafts von männlichen und 30 % von weiblichen Patienten untersucht werden. Das Gesamtdurchschnittsalter der Patienten beträgt 65 ± 7 Jahre. Das Durchschnittsalter der männlichen Personen liegt bei 63 ± 7 Jahre und das der weiblichen Personen bei 69 ± 8 Jahre. Dabei zeigen die benutzten Venengrafts keine erkennbaren phlebosklerotischen Veränderungen.

Tabelle 8: Verteilung der untersuchten Venengrafts nach Geschlecht und Alter der Patienten

	Gesamt	Männlich	Weiblich
Anzahl Patienten	30	21 (70 %)	9 (30 %)
Durchschnittsalter	65 J	63 J	69 J

3.2 Messwerte der Celsiorlösung

Während der Lagerung der Venengrafts in beiden gekühlten Celsiorlösungen wird in regelmäßigen Abständen die Temperatur, der pH-Wert sowie der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) beider Celsiorlösungen gemessen und dokumentiert.

Die Temperatur der nicht oxygenierten Celsiorlösung beträgt im Durchschnitt $2,92^\circ C$, wobei die höchste durchschnittliche Temperatur mit $3,6^\circ C$ zum Zeitpunkt 15 Minuten gemessen wird. Die niedrigste durchschnittliche Temperatur wird mit $2,63^\circ C$ zum Zeitpunkt 60 Minuten gemessen.

Der durchschnittliche, nicht Temperatur korrigierte pH-Wert der nicht oxygenierten Celsiorlösung liegt bei 7,44. Der durchschnittliche pH-Wert der oxygenierten Celsiorlösung liegt bei 7,34.

Der durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck (pO_2) der oxygenierten Celsiorlösung beträgt 1277 mmHg. Im Gegensatz dazu beträgt der pO_2 in der nicht oxygenierten Celsiorlösung im Durchschnitt 386 mmHg.

Tabelle 9: Gemessene Parameter der Celsiorlösungen während der Versuchsdurchführung

	Temperatur	pH-Wert	pO_2
Celsior ohne O_2	2,92°C	7,44	386 mmHg
Celsior mit O_2	3,34°C	7,34	1277 mmHg

3.3 Histologische Auswertung

Die histologischen Schnitte der gewonnenen Graft-Präparate zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten werden nach der immunhistochemischen TUNEL-Färbung mit Hilfe der Software analySIS® 3.0 systematisch beurteilt und ausgewertet.

Zuerst werden die H.E.-gefärbten Schnittpräparate inspiziert, wobei die Präparate eine normale anatomische Gefäßwandgliederung aufweisen müssen. Nur die Präparate, die eine intakte Venenwand aufweisen, werden für die Auswertung verwendet. Des Weiteren werden Präparate mit partiell abgelöstem Endothel ebenfalls nicht berücksichtigt.

Für die quantitative Auswertung werden anschließend von den TUNEL-gefärbten Präparaten jeweils 5 Gesichtsfelder der Wandschichten Endothel, Subendothel, Media und Adventitia fotografiert.

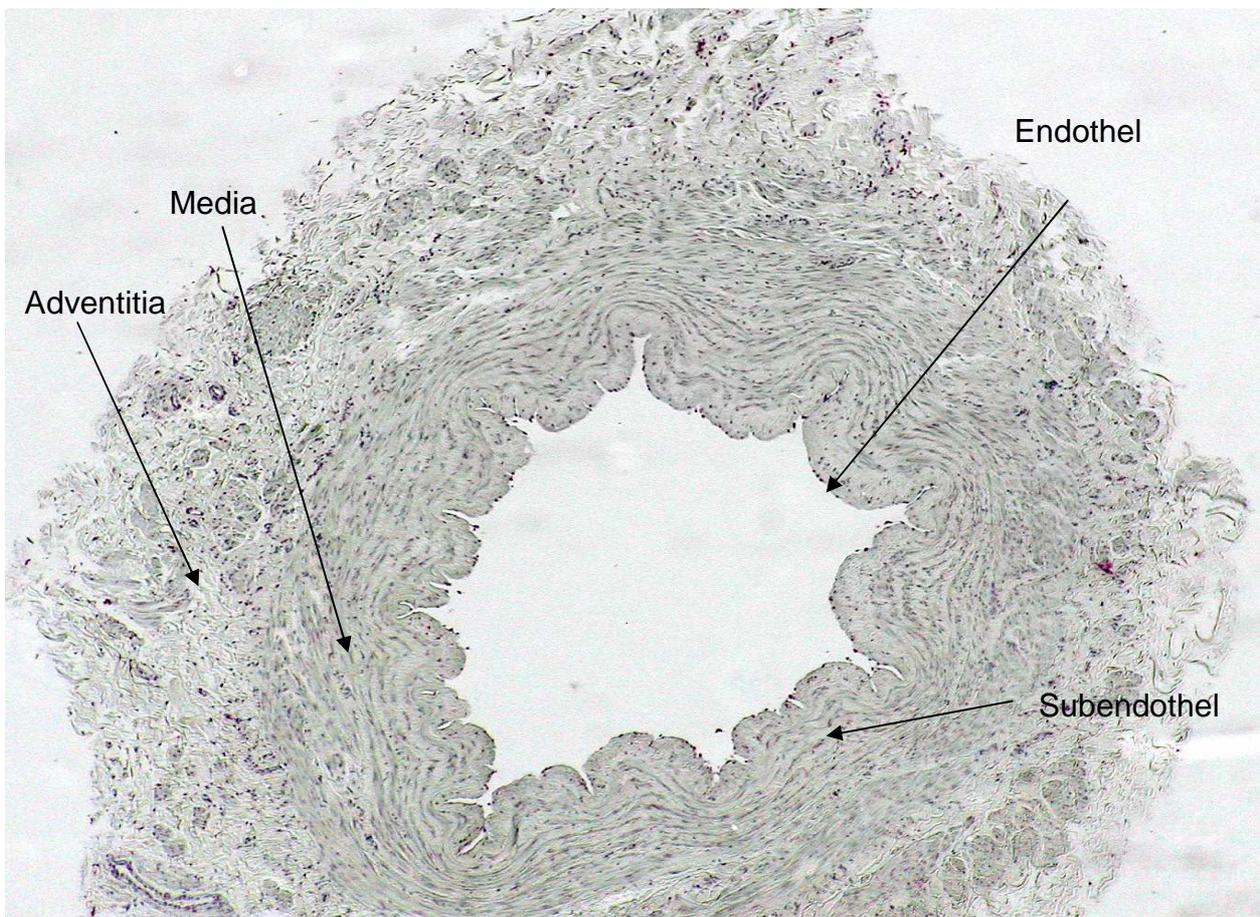


Abbildung 1: Histologischer Querschnitt eines Venengrafts mit erhaltenem Lumen. TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 80. Die innen liegende Intima wird in das Endothel und das Subendothel unterteilt, darauf folgen die Wandschichten Media und die Adventitia.

Anschließend werden mit Hilfe der analySIS[®] 3.0 Software die TUNEL-positiven Zellen detektiert. Aus den gewonnenen Einzelergebnissen der jeweils ausgewerteten Gesichtsfelder werden nun die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die jeweiligen Zeitpunkte und die entsprechende Wandschicht eines Venengrafts errechnet.

Des Weiteren wird aus den 5 Gesichtsfeldern die Gesamtzellzahl der einzelnen Wandschichten detektiert. Die so gewonnene Anzahl TUNEL-positiver Zellen wird in Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Der daraus resultierende Wert wird als Apoptoserate bezeichnet. Des Weiteren wird die Standardabweichung der Apoptoserate ermittelt.

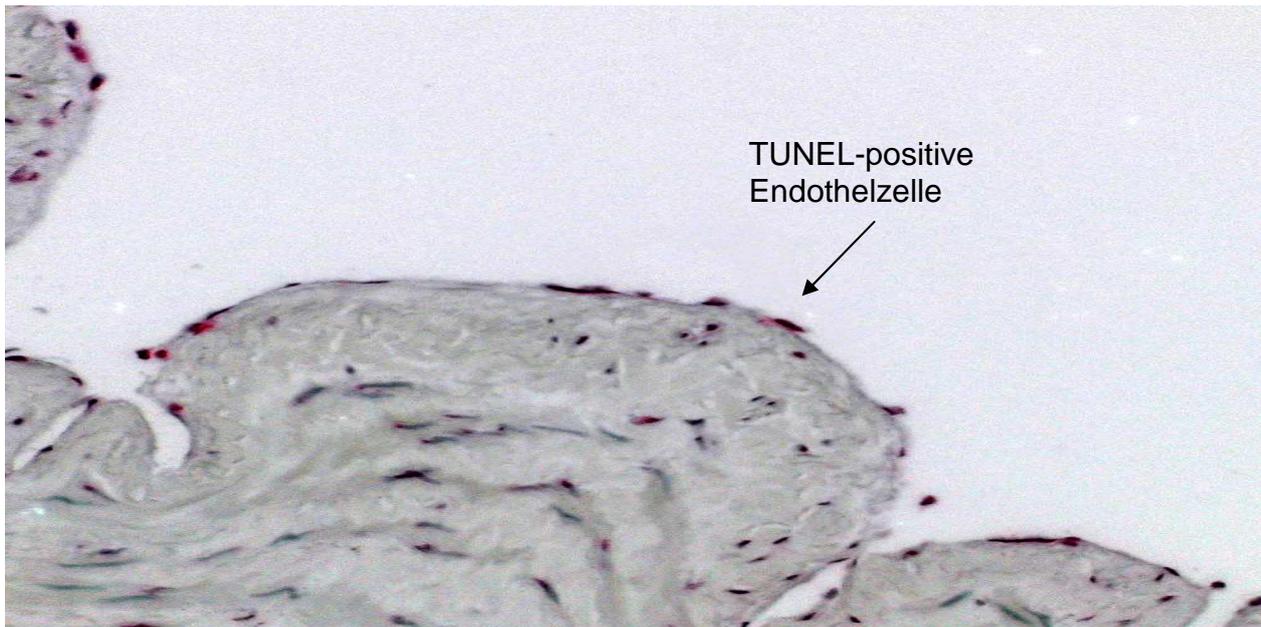


Abbildung 2: Gesichtfeldausschnitt Venengraft; TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 200. Erkennbar sind die Wandschichten Endothel, Subendothel und Media. TUNEL-positive Zellkerne zeigen sich rot gefärbt, TUNEL-negative Zellkerne sind blau gefärbt.

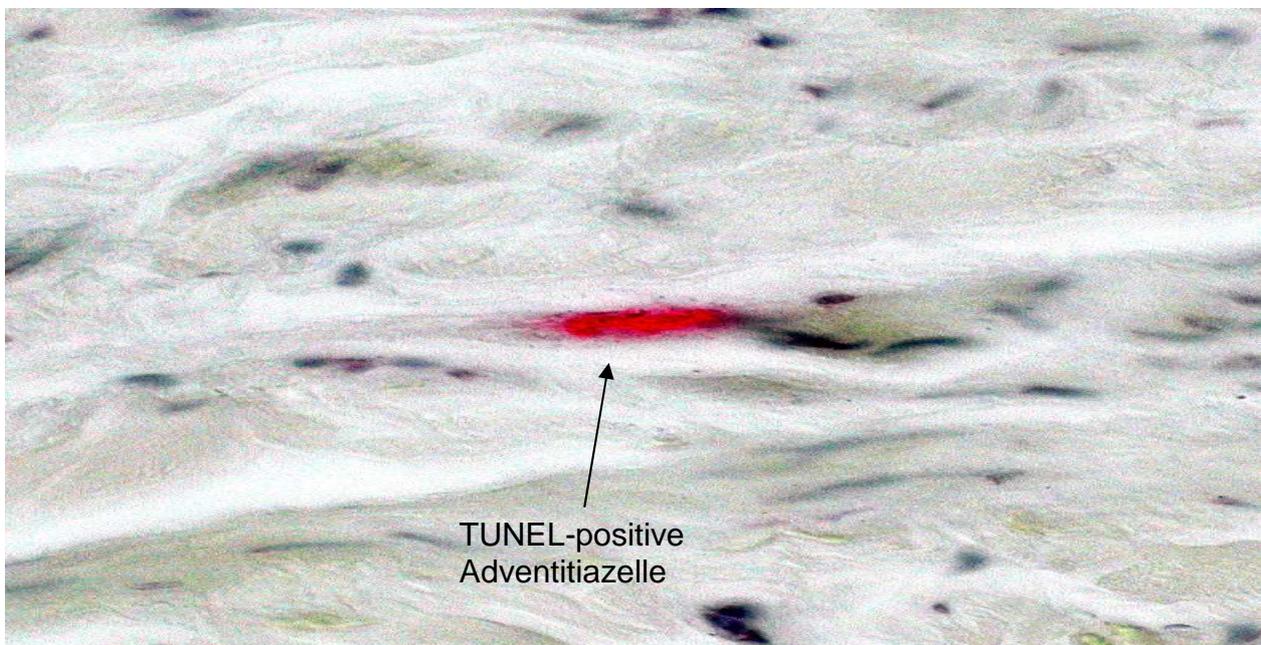


Abbildung 3: Gesichtfeldausschnitt Venengraft; TUNEL-Färbung, Vergrößerung x 400. TUNEL-positiver, rot gefärbter Zellkern in der Adventitia mit apoptotic bodies. Der TUNEL-positiv angefärbte Zellkern wird von TUNEL-negativen, blau gefärbten, Zellkernen umgeben.

3.4 Apoptoseraten in beiden Lösungen

Die quantitative Auswertung der Venengrafts aus der Gruppe der nicht oxygenierten Celsiorlösung zeigt für die einzelnen Wandschichten unterschiedliche Zeitverläufe.

Die Apoptoserate steigt in allen vier Wandschichten der untersuchten Venengrafts im zeitlichen Verlauf an.

Dabei zeigen die Werte in den Grenzschichten Endothel und Adventitia deutlich höhere Anstiegsraten im Vergleich zur Media und dem Subendothel.

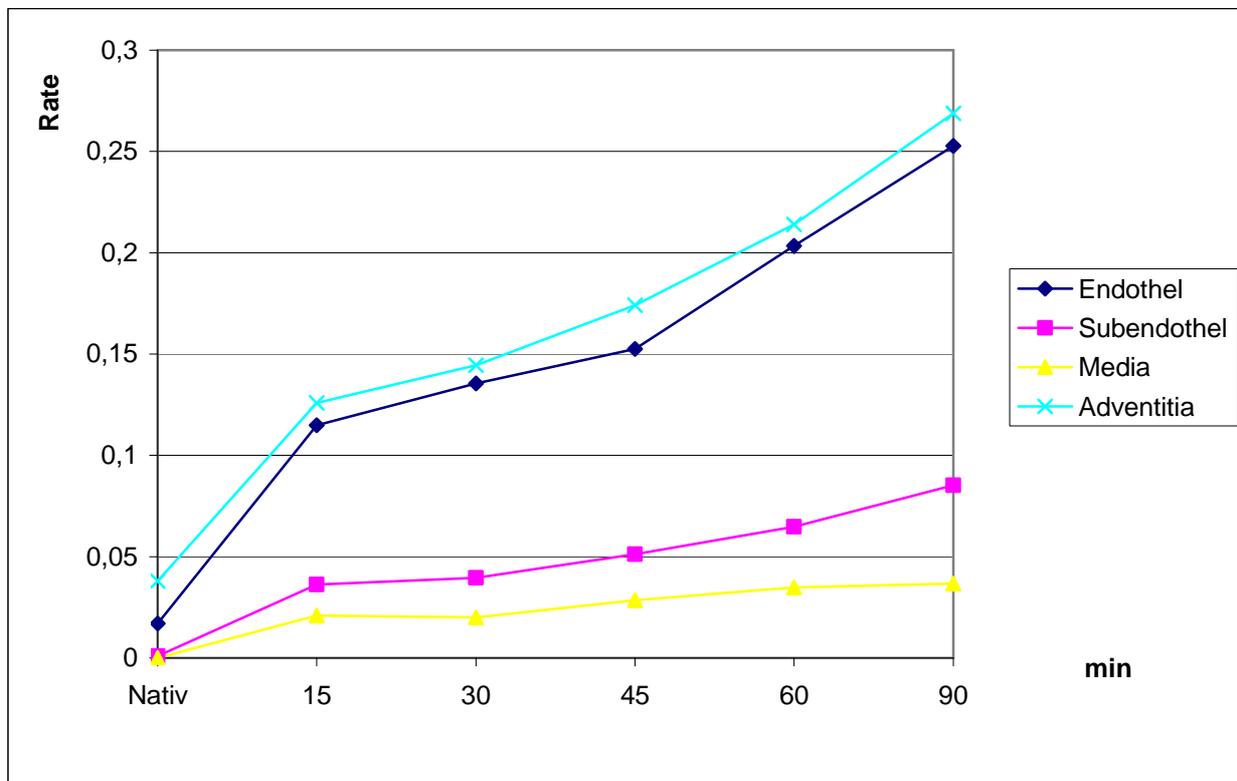


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseraten der ausgewerteten Wandschichten des Endothels, Subendothels, der Media und der Adventitia in der nicht oxygenierten Celsiorlösung.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der nicht oxygenierten Celsiorlösung zeigen sich in den einzelnen Wandschichten der ausgewerteten Venengrafts aus der Gruppe der oxygenierten Celsiorlösung ähnliche Steigerungen der Apoptoseraten.

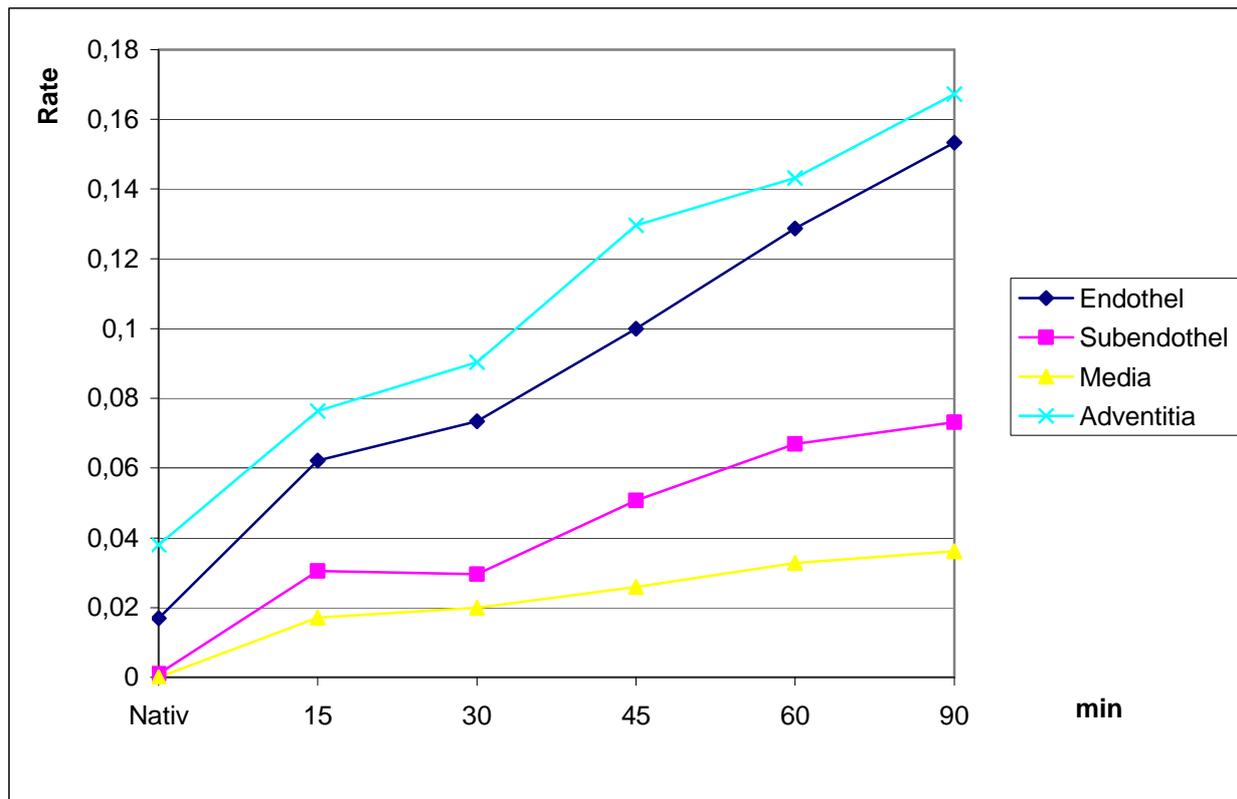


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseraten der ausgewerteten Wandschichten des Endothels, Subendothels, der Media und der Adventitia in der oxygenierten Celsiorlösung

3.5 Statistik

Die oben aufgeführten Ergebnisse der untersuchten Grafts zeigen im Zeitverlauf unterschiedlich steigende Apoptoseraten für die einzelnen Wandschichten. Des Weiteren unterscheiden sich die Apoptoseraten der einzelnen Wandschichten zwischen der oxygenierten und der nicht oxygenierten Celsiorlösung.

Mit Hilfe der Varianzanalyse werden die erhobenen Daten statistisch ausgewertet, um feststellen zu können, ob sich die unterschiedlichen Raten in den einzelnen Wandschichten zwischen oxygenierter und nicht oxygenierter Celsiorlösung signifikant voneinander unterscheiden. Zudem wird ermittelt, ob der Zeiteinfluss einen signifikanten Einfluss auf die steigenden Apoptoseraten besitzt.

3.5.1 Endothel

Im Endothel liegt die Apoptoserate in den nativen Grafts bei der Entnahme bei 1,7 %.

Anschließend steigt in der nicht oxygenierten Celsiorlösung die Apoptoserate zum Zeitpunkt 15 Minuten auf einen Wert von 11,49 % an. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigt sich ein weiterer Anstieg. Nach 30 Minuten liegt die Rate bei 13,56 %, nach 45 Minuten bei 15,26 % und nach 60 Minuten bei einem Wert von 20,33 %. Am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 90 Minuten wird ein Wert von 25,28 % ermittelt.

Dagegen steigt die Apoptoserate in der oxygenierten Celsiorlösung nach 15 Minuten auf einen Wert von 6,22 % an. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigt sich ein Wert von 7,35 % nach 30 Minuten und nach 45 Minuten von 10 %. Nach 60 Minuten liegt die Apoptoserate bei 12,88 %. Am Ende des Untersuchungszeitraumes nach 90 Minuten wird schließlich ein Wert von 15,33 % ermittelt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Apoptoserate im zeitlichen Verlauf in der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung (Mittelwert \pm SD; n = 30).

Gruppe		Apoptoserate	Standardabweichung	N
Endothel 15 min	ohne O ₂	0,1149	0,066	30
	mit O ₂	0,0622	0,035	30
Endothel 30 min	ohne O ₂	0,1356	0,067	30
	mit O ₂	0,0735	0,040	30
Endothel 45 min	ohne O ₂	0,1526	0,081	30
	mit O ₂	0,100	0,043	30
Endothel 60 min	ohne O ₂	0,2033	0,085	30
	mit O ₂	0,1288	0,034	30
Endothel 90 min	ohne O ₂	0,2528	0,137	30
	mit O ₂	0,1533	0,035	30

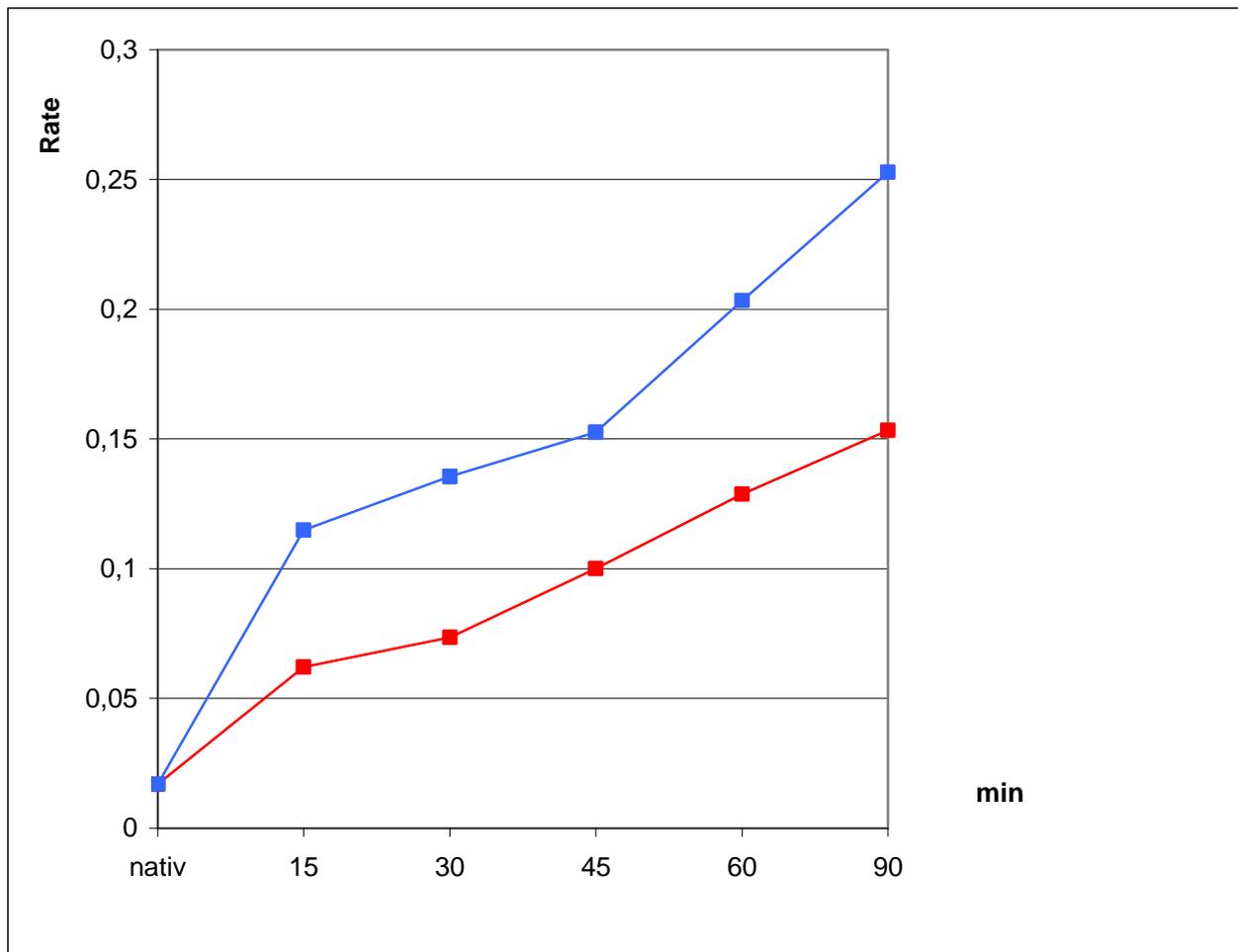


Abbildung 6: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseraten im Endothel (blau = Celsior ohne O₂; rot = Celsior mit O₂).

Der Haupteffekt des Messwiederholungsfaktors ist mit $p < 0,001$ statistisch signifikant. Damit liegt ein statistisch signifikanter Zeiteinfluss bzgl. der steigenden Apoptoseraten in beiden Celsiorlösungen vor.

Des Weiteren ist der Haupteffekt der Gruppenzugehörigkeit ebenfalls mit $p < 0,001$ statistisch signifikant, womit sich die unterschiedlichen Apoptoseraten zwischen der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung im Endothel signifikant voneinander unterscheiden.

3.5.2 Subendothel

Im Subendothel liegt die Apoptoserate in den nativen Grafts direkt nach Entnahme bei 0,1 %.

Anschließend liegt der Wert in der nicht oxygenierten Celsiorlösung nach 15 Minuten bei 3,62 %. Nach weiteren 15 Minuten steigt die Rate minimal auf einen Wert von 3,98 % an. Im weiteren Verlauf zeigen sich Werte von 5,13 % und 6,49 %. Schließlich liegt die Apoptoserate nach 90 Minuten bei 8,52 %.

In der oxygenierten Celsiorlösung liegt der Wert nach 15 Minuten bei 3,06 %. Nach weiteren 15 Minuten fällt die Rate minimal auf 2,97 % ab. Nach weiteren 15 Minuten kann jedoch ein neuerlicher Anstieg des Wertes auf 5,08 % verzeichnet werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf liegt die Apoptoserate nach 60 Minuten bei 6,69 %. Zum Schluss des Beobachtungszeitraums nach 90 Minuten liegt der Wert bei 7,32 %.

Tabelle 11: Ergebnisse der Apoptoseraten im zeitlichen Verlauf in der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung (Mittelwert \pm SD; n = 30).

Gruppe	Apoptoserate	Standardabweichung	N	
Subendothel 15 min	ohne O ₂	0,0362	0,031	30
	mit O ₂	0,0306	0,022	30
Subendothel 30 min	ohne O ₂	0,0398	0,027	30
	mit O ₂	0,0297	0,023	30
Subendothel 45 min	ohne O ₂	0,0513	0,029	30
	mit O ₂	0,0508	0,027	30
Subendothel 60 min	ohne O ₂	0,0649	0,027	30
	mit O ₂	0,0669	0,028	30
Subendothel 90 min	ohne O ₂	0,0852	0,045	30
	mit O ₂	0,0732	0,036	30

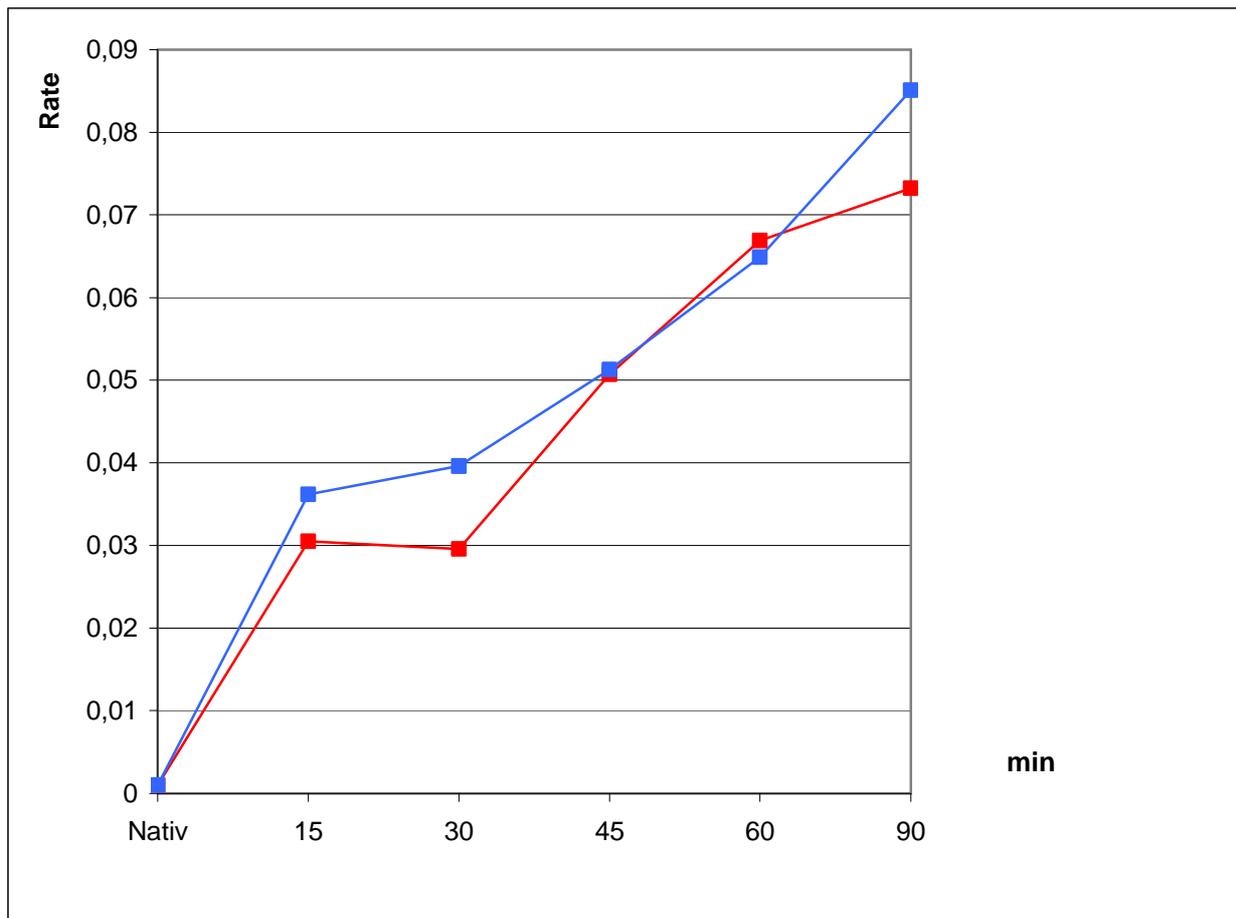


Abbildung 7: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseraten im Subendothel (blau = Celsior ohne O₂; rot = Celsior mit O₂).

Im Subendothel zeigt sich sowohl in der oxygenierten als auch in der nicht oxygenierten Celsiorlösung nach statistischer Auswertung ein signifikanter Zeiteinfluss mit $p < 0,001$ auf die steigenden Apoptoseraten.

Jedoch kann kein Einfluss der Gruppenzugehörigkeit noch eine Interaktion zwischen den Gruppen festgestellt werden, weshalb kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Lösungen hinsichtlich der Apoptoseraten besteht.

3.5.3 Media

In der Media sind direkt nach Entnahme in den nativen Grafts keine TUNEL-positiven Zellen nachweisbar.

Im weiteren zeitlichen Verlauf liegt die Apoptoserate in der nicht oxygenierten Celsiorlösung sowohl nach 15 als auch nach 30 Minuten bei 2,0 %. Nach weiteren 15 Minuten liegt der Wert bei 2,85 %. Nach 60 Minuten wird ein Wert von 3,48 % festgestellt. Nach 90 Minuten beträgt die Apoptoserate schließlich 3,69 %.

In der oxygenierten Celsiorlösung steigt die Apoptoserate nach 15 Minuten auf 1,72 % an. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigen sich Werte von 2,0 %, 2,59 % und 3,29 %. Nach 90 Minuten liegt die Apoptoserate schließlich bei 3,62 %.

Tabelle 12: Ergebnisse der Apoptoseraten im zeitlichen Verlauf in der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung (Mittelwert \pm SD; n = 30).

Gruppe		Apoptoserate	Standardabweichung	N
Media 15 min	ohne O ₂	0,0200	0,013	30
	mit O ₂	0,0172	0,012	30
Media 30 min	ohne O ₂	0,0200	0,015	30
	mit O ₂	0,0200	0,015	30
Media 45 min	ohne O ₂	0,0285	0,021	30
	mit O ₂	0,0259	0,018	30
Media 60 min	ohne O ₂	0,0348	0,027	30
	mit O ₂	0,0329	0,023	30
Media 90 min	ohne O ₂	0,0369	0,025	30
	mit O ₂	0,0362	0,025	30

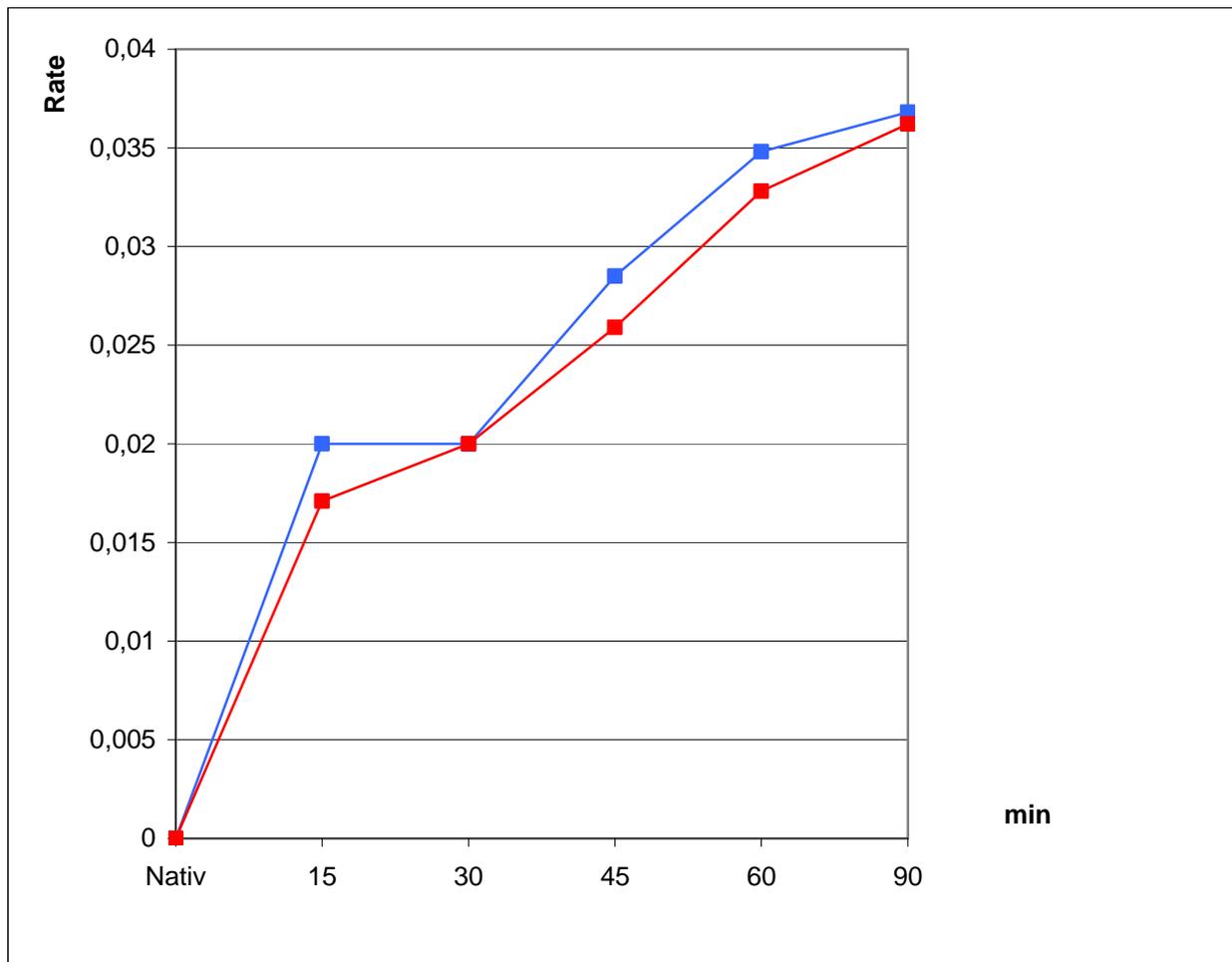


Abbildung 8: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseraten in der Media (blau = Celsior ohne O₂; rot = Celsior mit O₂).

In der Media zeigt sich ebenfalls in der oxygenierten als auch in der nicht oxygenierten Celsiorlösung nach statistischer Auswertung ein signifikanter Zeiteinfluss mit $p < 0,001$ auf die steigenden Apoptoseraten.

Jedoch kann, analog zum Subendothel, kein Einfluss der Gruppenzugehörigkeit noch eine Interaktion zwischen den Gruppen festgestellt werden, weshalb kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der oxygenierten und der nicht oxygenierten Celsiorlösung hinsichtlich der Apoptoseraten besteht.

3.2.4 Adventitia

In der Adventitia liegt die Apoptoserate in den entnommenen Grafts zum Zeitpunkt Null bei 3,8 %.

In der nicht oxygenierten Celsiorlösung steigt der Wert nach 15 Minuten auf 12,59 % an. Nach weiteren 15 Minuten liegt der Wert bei 14,46 %. Weiter steigende Apoptoseraten zeigen sich nach 45 Minuten mit 17,43 % sowie nach 60 Minuten mit 21,39 %. Am Ende der Untersuchung liegt der Wert nach 90 Minuten bei 26,87 %.

In der oxygenierten Celsiorlösung liegt die ermittelte Apoptoserate nach 15 Minuten bei 7,64 %. Nach weiteren 15 Minuten steigt der Wert auf 9,05 % an. Im weiteren Verlauf zeigt sich nach 45 Minuten ein Wert von 12,96 % und nach 60 Minuten von 14,32 %. Schließlich liegt die Apoptoserate am Ende der Untersuchung bei 16,73 %.

Tabelle 13: Ergebnisse der Apoptoseraten im zeitlichen Verlauf in der oxygenierten und nicht oxygenierten Celsiorlösung (Mittelwert \pm SD; n = 30).

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	N
Adventitia 15 min	ohne O ₂	0,1259	30
	mit O ₂	0,0764	30
Adventitia 30 min	ohne O ₂	0,1446	30
	mit O ₂	0,0905	30
Adventitia 45 min	ohne O ₂	0,1743	30
	mit O ₂	0,1296	30
Adventitia 60 min	ohne O ₂	0,2139	30
	mit O ₂	0,1432	30
Adventitia 90 min	ohne O ₂	0,2687	30
	mit O ₂	0,1673	30

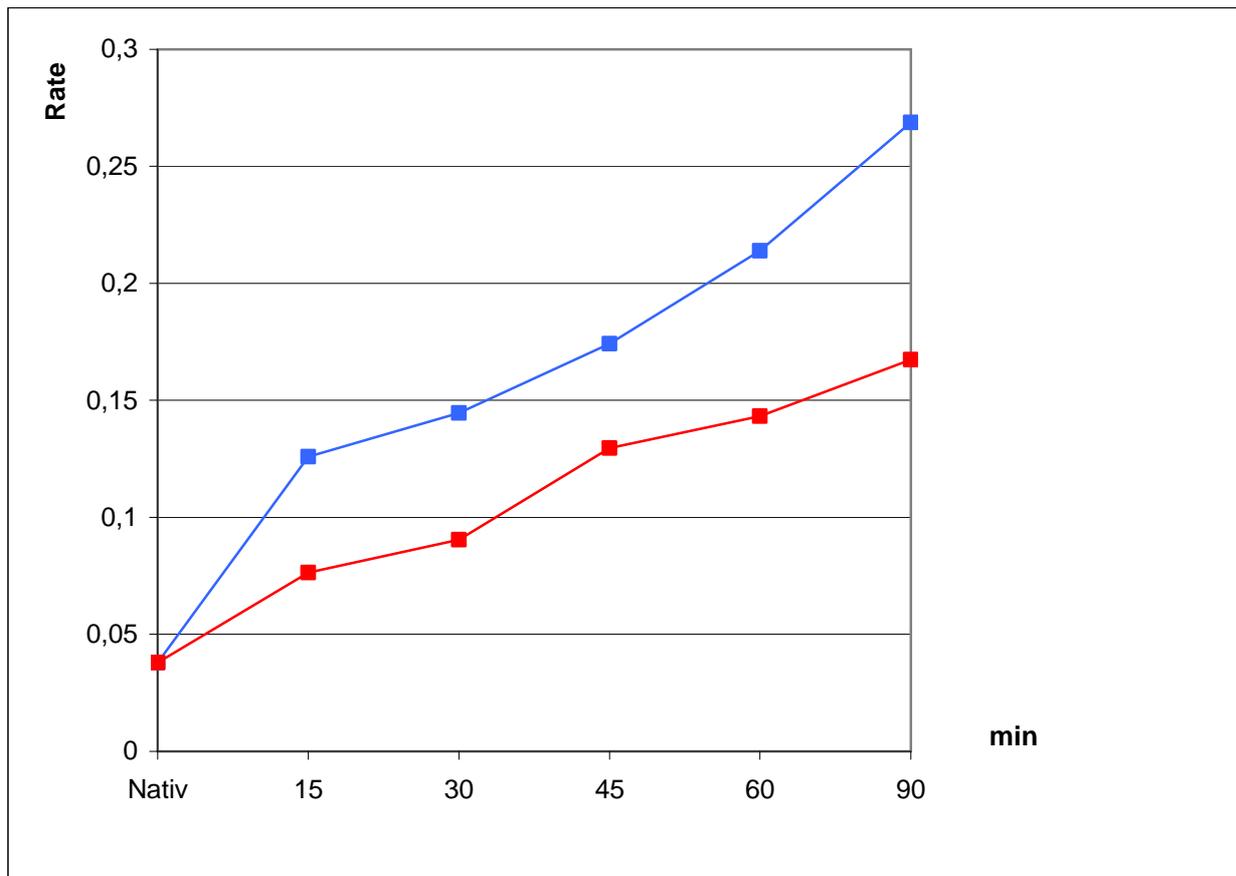


Abbildung 9: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseraten in der Adventitia (blau = Celsior ohne O₂; rot = Celsior mit O₂).

In der Adventitia zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Gruppenzugehörigkeit mit $p < 0,001$. Des Weiteren können für diese Messgrößen auch Interaktionen zwischen der Zeit und der Gruppenzugehörigkeit mit $p = 0,003$ gefunden werden.

Somit ergibt sich aus den statistischen Ergebnissen, dass die unterschiedlichen Apoptoseraten in der Adventitia zwischen oxygenierter und nicht oxygenierter Celsiorlösung signifikant sind.

Wie in den übrigen Wandschichten besteht auch in der Adventitia mit $p < 0,001$ ein signifikanter Zeiteinfluss.

4. Diskussion

Die im Langzeitverlauf auftretenden hohen Restenosierungs- und Verschlussraten venöser Grafts im Vergleich zu arteriellen Grafts stellen ein wesentliches Problem in der Herzchirurgie dar. Im Hinblick auf den demographischen Wandel der Bevölkerung in den Industrienationen mit steigender durchschnittlicher Lebenserwartung wächst die Notwendigkeit, Grafts für die Revaskularisation zu verwenden, die lange Zeiträume ohne Ausbildung signifikanter Stenosen oder Verschlüsse überbrücken können. Damit soll eine zweite Bypassoperation aufgrund stenosierter oder verschlossener Grafts so lange wie möglich hinausgezögert werden.

Bisher weisen lediglich arterielle Grafts eine geringe Rate an signifikanten Stenosen in längeren Zeitintervallen auf (Fitzgibbon et al., 1996). Bei koronarchirurgischen Eingriffen werden aber häufig mehrere Grafts verwendet. Aufgrund der begrenzten Anzahl an verwendbaren arteriellen Grafts werden überwiegend venöse Grafts benötigt, die weitaus schlechtere Langzeitergebnisse hinsichtlich der Restenosierungsraten und Graftverschlüsse aufweisen (Fitzgibbon et al., 1996).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Schädigung des Endothels der venösen Grafts während der operativen Entnahme und nach operativer Myokardrevaskularisation ausschlaggebend für die weiteren Veränderungen der Graftwand ist (Davies et al., 1994). Diese Graftveränderungen, die vom Ausmaß des Endothelschadens abhängig sind, begünstigen das postoperative Thromboserisiko, die Intimahyperplasie sowie die beschleunigt einsetzende Arteriosklerose. Heute werden alle Anstrengungen zur Minimierung des operativ bedingten Endothelschadens unternommen.

Der Einsatz einer geeigneten Lösung zur Überbrückung des ischämischen Intervalls stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zur Vermeidung von Endothelschäden dar, weshalb bisher eine Reihe unterschiedlicher Lösungen untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die kristalloide, extrazelluläre Celsiorlösung vor allem frühe Endothelzellschäden vermeiden kann und ob die Sauerstoffanreicherung der Lösung ischämisch bedingte Zellschäden minimieren kann.

Vor Beginn der Untersuchung gilt es festzulegen, mit welcher Lösungstemperatur der Versuch durchzuführen ist. In der Literatur wurde bereits häufig der Einfluss der Lösungstemperatur auf einen möglichen Endothelzellschaden des Venengrafts untersucht. In einigen Untersuchungen war zu beobachten, dass die Lagerung von Venen in einer 4°C kalten Lösung zu einem höheren Verlust von Endothelzellen führte, als die Lagerung in einer 20°C warmen Lösung. Die Kühlung der Lösung soll in diesem Zusammenhang zu einem Zusammenbruch des endothelialen Zytoskeletts führen. Die Anwendung einer normothermen Lösung wäre somit vorteilhaft gegenüber der Anwendung einer hypothermen Lösung (Solberg et al., 1987). Dagegen berichtet derselbe Autor in einer späteren Arbeit, dass bei einer 6-stündigen Lagerung von Venenproben in einer 20°C warmen Lösung signifikante Endothelzellschäden zu beobachten waren, während der Endothelzellschaden in der hypothermen Vergleichslösung signifikant geringer war (Solberg et al., 1992).

Aufgrund der heute allgemein gültigen Meinung, dass die Kühlung der Lösung einen protektiven Effekt durch die Minimierung des Zellmetabolismus bewirkt (Davies und Hagen, 1994; Gundry et al., 1980), wird in der vorliegenden Studie eine 4°C kalte Celsiorlösung angewendet. In weiteren Untersuchungen mit der Celsiorlösung, die bisher veröffentlicht wurden, ist ebenfalls die hypotherme Celsiorlösung verwendet worden (Alamanni et al., 2002; Barr et al., 1997; Cavallari et al., 2002; Garlicki, 2003; Menasche et al., 1994). Darüber hinaus empfiehlt die Herstellerfirma Imtix-Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins (Marcy L'Étoile, France) zur Organprotektion ein Temperaturoptimum für Celsior zwischen 2° und 8°C.

Bisher wurde die Celsiorlösung erfolgreich als universelle kalte Aufbewahrungslösung für alle intrathorakalen Organe angewendet (Barr et al., 1997; Menasche et al., 1994).

In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluss der Celsiorlösung auf kardiale Endothelzellen untersucht.

In einer vergleichenden Studie wurde Celsior mit den Lösungen Euro-Collins, St. Thomas, UW sowie mit dem Medium M199 bezüglich ihrer Auswirkungen auf Endothelzellen untersucht (Alamanni et al., 2002). Dabei zeigt Celsior neben M199 und UW während eines Beobachtungszeitraumes von 24 und 48 Stunden keinen signifikanten Endothelzellverlust unter hypothermen Bedingungen.

In einer weiteren Untersuchung wurde Celsior mit den Lösungen UW und Bretschneider hinsichtlich der entstehenden Vaskulopathie an transplantierten Herzen verglichen (Garlicki, 2003). Dabei wiesen die Celsiorproben die niedrigste Hypertrophie der Koronarwände nach einer Ischämiezeit von 3 bis 4,5 Stunden auf. Ausschlaggebend hierfür ist die geringste Intimahyperplasie in der Celsiorgruppe.

In einer weiteren Vergleichsstudie wurde ebenfalls die Auswirkung des benutzen Lagerungsmediums auf die Intimahyperplasie in Koronararterien untersucht. Im Vergleich zur Ringerlaktatlösung und einer kardioplegischen Blutlösung zeigt Celsior die niedrigste Intimahyperplasierate (Perrault et al., 2005). Aufgrund dieser Resultate scheint Celsior in der Lage zu sein, eine gute Prävention der Endothelzellen zu gewährleisten, da das Ausmaß der nachfolgenden Intimahyperplasie maßgeblich vom Ausmaß des primären Endothelschadens abhängt (Motwani und Topol, 1998). Eine vergleichbare Studie bzgl. der Vermeidung frühischämischer Endothelzellschäden in Venengrafts wurde mit Celsior bisher nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Studie zeigen sich unterschiedlich hohe Apoptoseraten in den einzelnen Wandschichten der Venengrafts. Das Endothel sowie die Adventitia, die als Kontaktschichten dem hypothermen Lagerungsmedium direkt ausgesetzt sind, zeigen höhere Apoptoseraten im Vergleich zur Media und dem Subendothel, die keinen direkten Kontakt zur Lösung hatten.

Die höchsten Apoptoseraten werden in der Adventitia detektiert. In der Adventitia liegt, im Unterschied zu übrigen Wandschichten, der Anteil der apoptotisch veränderten Zellen direkt nach Entnahme bereits bei ca. 5 %. Dieser Tatbestand ist durch die vorangegangene chirurgische Präparation erklärbar. Nach den ersten 15 Minuten zeigen 12,59 % der Zellen apoptotische Veränderungen. Die Apoptoseraten steigen im weiteren zeitlichen Verlauf bis auf 26,87 % nach 90 Minuten an (siehe Tab. 13).

Das Endothel, das als Kontaktschicht ebenfalls der Celsiorlösung ausgesetzt war, weist nach 15 Minuten 11,49 % apoptotisch veränderte Zellen auf. Hier steigen die Apoptoseraten im weiteren zeitlichen Verlauf ebenfalls weiter an und erreichen einen Wert von 25,27 % nach 90 Minuten (siehe Tab. 10).

Dagegen weisen die Zellen in der Media sowie im Subendothel im Vergleich zum Endothel und zur Adventitia geringere Apoptoseraten auf.

Im Subendothel werden nach 15 Minuten 3,62 % apoptotisch veränderte Zellen detektiert, wobei im weiteren Verlauf eine geringere Steigerungsrate als im Endothel und in der Adventitia beobachtet werden kann. Nach 90 Minuten zeigen 8,52 % der Zellen des Subendothels apoptotische Veränderungen.

In der Media ist im Vergleich dazu eine noch geringere Steigerung zu beobachten. Nach 15 Minuten liegt die Rate an apoptotischen Zellen bei 2,1 % und steigt nur unwesentlich auf 2,52 % nach 90 Minuten an (siehe Tab. 11 und 12).

Die statistische Auswertung ergibt dennoch, dass ein signifikanter Einfluss des Zeitverlaufs auf die steigenden Apoptoseraten in allen vier untersuchten Wand-schichten mit einem jeweiligen Wert von $p < 0,001$ besteht.

Damit bleibt festzuhalten, dass im Beobachtungszeitraum die Rate an apoptotisch veränderten Zellen in allen Gefäßwandkompartimenten im Zeitverlauf steigt und auch bei längerer Lagerung weiter zunimmt.

Folgende Eigenschaften von Celsior erlauben eine Aussage über das protektive Potential bei der Preservation von venösen Grafts innerhalb des hier untersuchten Zeitrahmens. Die in Lösungen enthaltene Antioxidantien schützen vor freien Radikalen. Diese sind insofern von Bedeutung, da während des ischämischen Intervalls u.a. freie Radikale produziert werden, die unterschiedliche Reaktionen auslösen (Kukreja und Hess, 1992). Die Oxidation von Membranlipiden durch freie Radikale führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität und bewirkt eine Ödembildung in Endothelzellen und deren Dysfunktion (Garlicki, 2003). Celsior enthält im Unterschied zu anderen kristalloiden Lösungen vier verschiedene Antioxydantien. Dazu zählen reduziertes Glutathion, Histidin, Mannitol und Laktobionat (Garlicki, 2003). Gerade diese Antioxydantien bewirken, dass Celsior eine effektive Inaktivierung freier Radikale gewährleistet, was bereits in vitro demonstriert werden konnte (Garlicki, 2003; Pietri et al., 1994). Diese Antioxydantien spielen insbesondere bei der Protektion von Endothelzellen eine entscheidende Rolle, weshalb gerade Celsior bisher sehr gute Ergebnisse aufweisen konnte (Garlicki, 2003).

Des Weiteren inaktivieren freie Radikale die Ca^{2+} -ATPase, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Eine Hyperkalzämie der Zelle führt zu einer verlängerten Membrandepolarisation und damit zu irreparablen Schäden der Zellen (Garlicki, 2003). Dieser Effekt wird ebenfalls durch die in der Celsiorlösung vorhandenen Antioxydantien minimiert.

Weitere Mechanismen, die zu einer Hyperkalzämie der Zellen während des ischämischen Intervalls führen, beeinflussen die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle, wodurch eine vermehrte passive Na^+ -Diffusion nach intrazellulär und eine vermehrte Freigabe von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum entsteht (Garlicki, 2003). Im Unterschied zur Lösung University of Wisconsin werden die Zellen in der Celsiorlösung vor einer Hyperkalzämie, neben einer hohen Konzentration an Natrium, vor allem durch die Anwesenheit von Magnesium, einem Kalziumantagonisten, geschützt.

Der sinkende Energiegehalt unter hypothermen und ischämischen Bedingungen stellt einen weiteren wichtigen Faktor dar. Dies führt ebenfalls zu einer Inaktivierung der Ca^{2+} -ATPase mit daraus resultierender Hyperkalzämie. Dem drohenden Energieverlust der Zellen wird durch das Vorhandensein von Glutamat in Celsior entgegen getreten (Garlicki, 2003; Cavallari et al., 2002).

Weiterhin verursachen die Hypothermie sowie die anaeroben Bedingungen in der Aufbewahrungslösung eine Inhibierung der Na^+/K^+ -ATPase mit daraus resultierender Ödembildung in den Zellen (Belzer und Southard, 1988). Zur Prophylaxe vor dem drohendem Zellödem enthält Celsior Lactobionat sowie Mannitol, wodurch der extrazelluläre osmotische Druck erhöht wird und somit die mögliche Entwicklung eines Zellödems minimiert wird (Garlicki, 2003). Vor allem Lactobionat zeigt eine sehr effektive Ödemprävention in isolierten Rattenherzen bei längerer Lagerung in der hypothermen Celsiorlösung (Menasche et al., 1993).

Aufgrund der oben aufgeführten unterschiedlichen Protektionseigenschaften der Celsiorlösung können mehrere Hypothesen aufgestellt werden. Die Präventionseigenschaften der Celsiorlösung wurden bisher nur bei längeren Ischämiezeiträumen untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass während der Lagerung der venösen Grafts in der Celsiorlösung in der frühen ischämischen und hypothermen Phase zwar

steigende Apoptoseraten zu beobachten sind. Im Vergleich zu anderen Lösungen kann die Celsiorlösung aber in der Lage sein, den Zellschaden so gering wie möglich zu halten.

Vor allem eine Reduktion des Endothelzellschadens könnte die Rate der thrombotischen Graftverschlüsse in der frühen postoperativen Phase reduzieren. Weiterhin kann im weiteren postoperativen Verlauf durch eine höhere Anzahl an intakten Endothelzellen das Ausmaß der einsetzenden Intimahyperplasie reduziert werden. Die bei ischämischen und hypothermen Bedingungen induzierten Zellschäden in den Vasa vasorum der Adventitia können durch die Celsiorlösung ebenfalls minimiert werden. Dadurch werden weitere ischämische Zellschäden an glatten Muskelzellen reduziert. Somit könnte das Ausmaß der Intimahyperplasie zusätzlich minimiert werden. Eine Reduktion der Intimahyperplasie führt zu einer Minimierung der später einsetzenden, beschleunigten Arteriosklerose in venösen Grafts.

Insgesamt könnte durch die Lagerung der venösen Grafts in der Celsiorlösung die Bypassvaskulopathie vermindert werden, was zu einer Reduktion der Stenose- und Verschlussraten in venösen Grafts führt.

In neueren Studien konnte bisher gezeigt werden, dass die Aufbewahrung von Transplantaten in oxygenierten Lagerungsmedien im Gegensatz zu nicht oxygenierten Medien eine bessere postoperativ einsetzende Transplantatfunktion sowie eine verbesserte Integrität des Gewebes bewirkten (Minor et al., 2005). Gerade für die Langzeitpreservation von Organen ist diese Form der Oxygenierung sehr effektiv (Okada et al., 1996; Bando et al., 1988). Oxygenierte Lösungen eliminieren oder reduzieren die durch Sauerstoffradikale hervorgerufene Dysfunktion des Transplantates, welche nach längeren hypothermen Aufbewahrungszeiträumen entsteht (Tsutsumi et al., 2001).

Bisher wurde keine Studie durchgeführt, in der untersucht wurde, ob eine oxygenierte kristalloide Lösung Venengrafts vor ischämischen und hypothermen Zellschäden schützen kann.

In der vorliegenden Untersuchung ergeben sich, analog zu den Ergebnissen in der nicht oxygenierten Celsiorlösung, für alle Wandschichten im untersuchten Zeitraum steigende Apoptoseraten in der oxygenierten Celsiorlösung.

Dabei zeigen sich auch in der oxygenierten Celsiorlösung höhere Apoptoseraten im Endothel und in der Adventitia als in den Wandschichten des Subendothels und der Media (Abb. 5). Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse ergibt auch hier mit einem jeweiligen Wert von $p < 0,001$ einen signifikanten Zeiteinfluss auf die steigenden Apoptoseraten in allen vier untersuchten Wandschichten.

Um zu klären, ob die Oxygenierung der Celsiorlösung einen besseren protektiven Schutz vor ischämischen und hypothermen Zellschäden gewährleisten kann, werden die Einzelergebnisse beider Celsiorlösungen miteinander verglichen.

Im Endothel liegt die Apoptoserate nach 15 Minuten in der oxygenierten Celsiorlösung 5,27 %-Punkte niedriger als in der nicht oxygenierten Celsiorlösung. Im weiteren zeitlichen Verlauf steigen die Apoptoseraten in beiden Lösungen deutlich an, wobei das Endothel in der oxygenierten Celsiorlösung durchweg niedrigere Werte aufweist als das Endothel in der nicht oxygenierten Celsiorlösung. Nach 90 Minuten liegt in der oxygenierten Celsiorlösung die Apoptoserate im Endothel sogar knapp 10 %-Punkte niedriger als in der nicht oxygenierten Lösung (Abb. 6 und Tab. 10). Die statistische Auswertung der unterschiedlich hohen Apoptoseraten im Endothel mit $p < 0,001$ ergibt, dass der Endothelzellschaden in der oxygenierten Celsiorlösung signifikant niedriger ausfällt als in der nicht oxygenierten Lösung.

Eine ähnliche Entwicklung lässt sich auch in der Adventitia erkennen. Hier liegt die Apoptoserate in der oxygenierten Lösung nach 15 Minuten 4,96 %-Punkte niedriger im Vergleich zur nicht oxygenierten Lösung. Auch hier steigen im weiteren zeitlichen Verlauf die Apoptoseraten in beiden Lösungen deutlich an. Dabei weist die Adventitia in der oxygenierten Celsiorlösung ebenfalls durchweg niedrigere Werte auf als die Adventitia in der nicht oxygenierten Celsiorlösung. Nach 90 Minuten liegt die Apoptoserate in der oxygenierten Celsiorlösung ebenfalls mit einer Differenz von 10 %-Punkten deutlich niedriger im Vergleich zur nicht oxygenierten Celsiorlösung (Abb. 9 und Tab. 13). Die statistische Auswertung der unterschiedlich hohen Apoptoseraten in der

Adventitia mit $p < 0,003$ ergibt, dass der Zellschaden auch in dieser Wandschicht in der oxygenierten Celsiorlösung signifikant niedriger ausfällt als in der nicht oxygenierten Lösung.

In den Wandschichten des Subendothels sowie in der Media zeigen sich dagegen allenfalls minimale, nicht signifikante Differenzen der Apoptoseraten zwischen oxygenierter und nicht oxygenierter Celsiorlösung.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann durch die Oxygenierung der Celsiorlösung der ischämische und hypotherme Zellschaden, insbesondere im Endothel und in der Adventitia signifikant reduziert werden im Vergleich zu der nicht oxygenierten Celsiorlösung.

Bisher wurde kein ähnlicher Vergleich bezüglich einer möglichen Minimierung von frühen Zelltodereignissen in venösen Grafts mit einem oxygenierten Lagerungsmedium in der Literatur beschrieben. Dennoch können aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Preservation von Organen in oxygenierten Lagerungsmedien Rückschlüsse auf die Optimierung der Lagerung gezogen werden.

Durch die Oxygenierung von Lagerungsmedien wird die intrazelluläre ATP-Konzentration in Organen erhöht. Dabei ist die Aufrechterhaltung eines basalen aeroben Metabolismus entscheidend (Minor et al., 2005, Tsutsumi et al., 2001). Durch einen möglichen aeroben Metabolismus unter hypothermen Bedingungen wird eine Konzentrationssteigerung an ATP möglich. Damit kann die Na^+/K^+ -ATPase in einem aktiven Zustand verbleiben, wodurch die Prävention der Zelle vor einer Na^+ -Überladung sichergestellt wird (Cross et al., 1996).

Obwohl Celsior nicht über Sauerstoffcarrier verfügt und eine schlechte Sauerstoffabsorption aufweist, ist die oxygenierte Celsiorlösung sehr effektiv bei der Aufrechterhaltung eines basalen aeroben Metabolismus (Tsutsumi et al., 2001).

Das in Celsior vorhandene Glutamat spielt für die Energieproduktion der Zelle unter hypothermen Bedingungen ebenfalls eine wichtige Rolle (Tsutsumi et al., 2001).

Da speziell Endothelzellen sehr empfindlich auf ein Energiedefizit reagieren (Minor et al., 2005), lässt sich erklären, warum die Apoptoseraten im Endothel und in der

Adventitia in der oxygenierten Celsiorlösung signifikant niedriger ausfallen als in der nicht oxygenierten Celsiorlösung. Die Sauerstoffanreicherung der Celsiorlösung führt zu einer Erhöhung der ATP-Konzentration in den Endothel- und Adventitiazellen. Dadurch kann ein basaler Metabolismus in den Endothelzellen aufrechterhalten werden, wodurch letztendlich die Gefahr einer ischämischen und hypothermen Apoptoseinduktion in den Zellen reduziert werden kann. Zum anderen bewirkt die hohe Konzentration an Antioxydantien der Celsiorlösung einen guten Schutz vor einer höheren Konzentration an freien Sauerstoffradikalen, die während der Sauerstoffanreicherung entstehen können.

Insgesamt kann durch die Anreicherung der Celsiorlösung mit Sauerstoff das frühe Zelltodereignis im Endothel weiter gesenkt werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass durch eine höhere Anzahl an intakten Endothelzellen nach Implantation des Grafts die Rate an thrombotischen Verschlüssen, das Ausmaß der Intimahyperplasie sowie der Grad der beschleunigten Arteriosklerose im Vergleich zur nicht oxygenierten Celsiorlösung weiter reduziert werden kann. Die weitere Reduktion der Apoptoserate in der Adventitia kann ebenfalls positive Auswirkungen auf das Gefäßremodeling haben. Die Ischämie bewirkt in der Adventitia den Verlust an Vasa vasorum, wodurch, neben dem Verlust von Endothelzellen ebenfalls die Zellproliferation angeregt wird und eine verstärkte Intimahyperplasie entsteht (Barker et al., 1993; Cho et al., 1997; Kumar et al., 1997). Die Sauerstoffanreicherung der Celsiorlösung vermindert den Verlust an Vasa vasorum, wodurch der Grad der Intimahyperplasie weiter gesenkt werden kann und damit letztendlich die Rate an nicht verschlossenen bzw. nicht höhergradig stenosierte venösen Bypässen im Langzeitverlauf erhöht werden kann.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde anhand humaner venöser Grafts untersucht, inwieweit die kristalloide Celsiorlösung in der Lage ist, frühischämische Zelltodereignisse in venösen Grafts zu minimieren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die zusätzliche Sauerstoffanreicherung der Lösung die frühischämischen Zelltodereignisse weiter reduzieren kann.

Die Studie umfasste 30 humane venöse Graftproben. Die Graftproben wurden in einer hypothermen Celsiorlösung und in einer hypothermen, oxygenierten Celsiorlösung über einen Zeitraum von 90 Minuten gelagert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten wurde jeweils eine Graftprobe entnommen und in Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Auswertung der Proben mittels des TUNEL-Assay, wobei apoptotisch veränderte Zellen detektiert wurden. Die gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend mittels der Varianzanalyse statistisch ausgewertet.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass in den Kontaktschichten des Endothels und der Adventitia die höchsten Apoptoseraten in beiden Lösungen auftreten. In den Wandschichten des Subendothels und der Media werden zwar ebenfalls steigende Werte ermittelt, jedoch mit niedrigeren Steigerungsraten. Für alle vier Wandschichten kann ein signifikanter Einfluss des Zeitverlaufes auf die steigenden Apoptoseraten festgestellt werden.

Des Weiteren zeigen sich im Endothel und in der Adventitia in der oxygenierten Celsiorlösung signifikant niedrigere Apoptoseraten im Vergleich zur nicht oxygenierten Celsiorlösung. Dagegen bestehen zwischen dem Subendothel und der Media keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Lösungen.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse wird ersichtlich, dass während der Lagerung der venösen Grafts in der Celsiorlösung frühischämische Zelltodereignisse auftreten. Aufgrund der bisher guten Ergebnisse der Celsiorlösung bzgl. der Protektion thorakaler Organe könnte mit Hilfe dieser Lösung das Ausmaß des Endothelzellschadens jedoch minimiert werden.

Des Weiteren zeigt der Vergleich zwischen der oxygenierten und der nicht oxygenierten Celsiorlösung, dass die Oxygenierung der Lösung eine weitere Reduktion der Apoptoseraten insbesondere im Endothel und in der Adventitia bewirkt.

Somit kann durch die Oxygenierung der Celsiorlösung der endotheliale Zellschaden in venösen Grafts weiter reduziert werden, wodurch die Graftvaskulopathie positiv beeinflusst werden kann. Somit könnte letztendlich die Rate an Graftverschlüssen und signifikanten Graftstenosen im weiteren postoperativen Verlauf reduziert werden.

6. Anhang

Einzelschritte bei der Auswertung mit der Software **analySIS® 3.0**

Zur genauen Analyse mit **analySIS® 3.0** müssen nun folgende Einstellungen im Programm vorgenommen werden:

1. Im Bild-Manager einen Bildspeicher aktivieren. Anschließend über **Datei > Öffnen** das entsprechende Bild laden.
2. Über **Extra > Symbolleiste bearbeiten** und sicherstellen, dass **Analyse** eingestellt ist, damit die entsprechenden Buttons in der Symbolleiste zu sehen sind.
3. Für die Analyse werden die einzelnen Buttons der Reihe nach bearbeitet.
 - a) Schwellwert setzen: Mit dieser Funktion wird eingestellt, welche Farbbereiche das Programm getrennt voneinander detektieren soll. Zuerst müssen die Werte für die unteren und oberen Grenzen der einzelnen Phasen definiert werden. Dazu wählt man unter dem Menüpunkt **Pixelwerte > Neu** im aktivierten Bild den gewünschten Farbbereich der Kernphasen manuell aus. Weiterhin können die oberen und unteren Grenzwerte zusätzlich noch mit Hilfe eines Histogramms für die Farbkanäle verändert werden.
 - b) ROIs definieren: Mit dem Button **ROIs definieren** kommt man ins gleichnamige Menü, in dem man den Bereich (ROI= Room of Interest) einzeichnet, der untersucht werden soll.
 - c) Klassifizierung definieren: Ein Klassifikationsschema besteht aus einem Namen, einer Einheit und einer Klasseneinteilung. Mit einem Klassifikationsschema werden Messwerte in bestimmte Klassen eingeteilt. Eine Klasse ist ein Wertebereich innerhalb des Klassifikationsschemas und wird durch einen oberen und unteren Grenzwert definiert. Jede Klasse ist durch ihre Klassen-ID identifiziert, die aus einer fortlaufenden Nummer besteht (1, 2, 3, ...). Jede Klasse kann durch einen Klassennamen und eine eigene Farbe gekennzeichnet werden. Um einen Satz von ganzzahligen Werten zu erhalten (1,2,...10;), wird die Klasse 1 definiert von **0,5 bis 1,5** und die Klasse 2 von **1,5 bis 2,5**. Damit wird der Wert 1 sicher der Klasse eins und der Wert 2 sicher der Klasse zwei zugeordnet. Anschließend muss die Klassifizierung berechnet werden. Über

berechnen werden die obere und die untere Grenze des Klassifikationsschema bestimmt. Die untere Grenze liegt bei **0,5** und die obere bei **2,5**. Mit der Funktion **Anzahl** gibt man die Anzahl der Klassen ein. Zuletzt muss im Modus **linear** eingegeben werden, damit die Werte in äquivalente Wertebereiche eingeteilt werden.

d) Messungen definieren: Über diese Befehle werden die Messungen gewählt, die während der Detektion ausgeführt werden. Messungen für Partikel, Klassen und ROIs werden getrennt voneinander festgelegt. Für die Untersuchung wurden folgende Messungen durchgeführt: Anzahl Partikel gesamt, Anzahl Partikel Klassen, Dichte Partikel aller Klassen und Fläche ROI.

e) Detektion definieren: Mit dem Button **Detektion definieren** kann man die Pixelzahl angeben, die mindestens vorhanden sein soll, damit eine Ansammlung von Pixeln, die den Suchkriterien entsprechen, als Partikel wahrgenommen werden. Über den Menüpunkt **Randpartikel** wird festgelegt, dass Randpartikel nicht mit einbezogen werden sollen. Über **Konnektivität** wird bestimmt, wie die Pixel eines Partikels zusammenhängen. Über **Seitenkanten** wird festgelegt, dass zwei gleichfarbige Pixel nur dann zu einem Partikel gehören, wenn sie sich mit einer Seitenfläche berühren. Über **Suchbereich** wird der ROI als Suchfeld aktiviert.

4. Nach Einstellung der Parameter erfolgt die Durchführung der Detektion.

5. Ergebnisse: Die Ergebnisse der Detektion werden tabellarisch über die Buttons **Partikelergebnisse**, **Klassenergebnisse** und **Rahmen/ROI-Ergebnisse** angezeigt. Lediglich die Tabellen der Klassenergebnisse und Rahmen/ROI-Ergebnisse sind mit ihren Daten für die Auswertung von Bedeutung. Da keine weitere Bearbeitung der Daten im Programm analySIS® 3.0 möglich ist, werden die Ergebnistabellen in eine Microsoft Excel-Datei überführt.

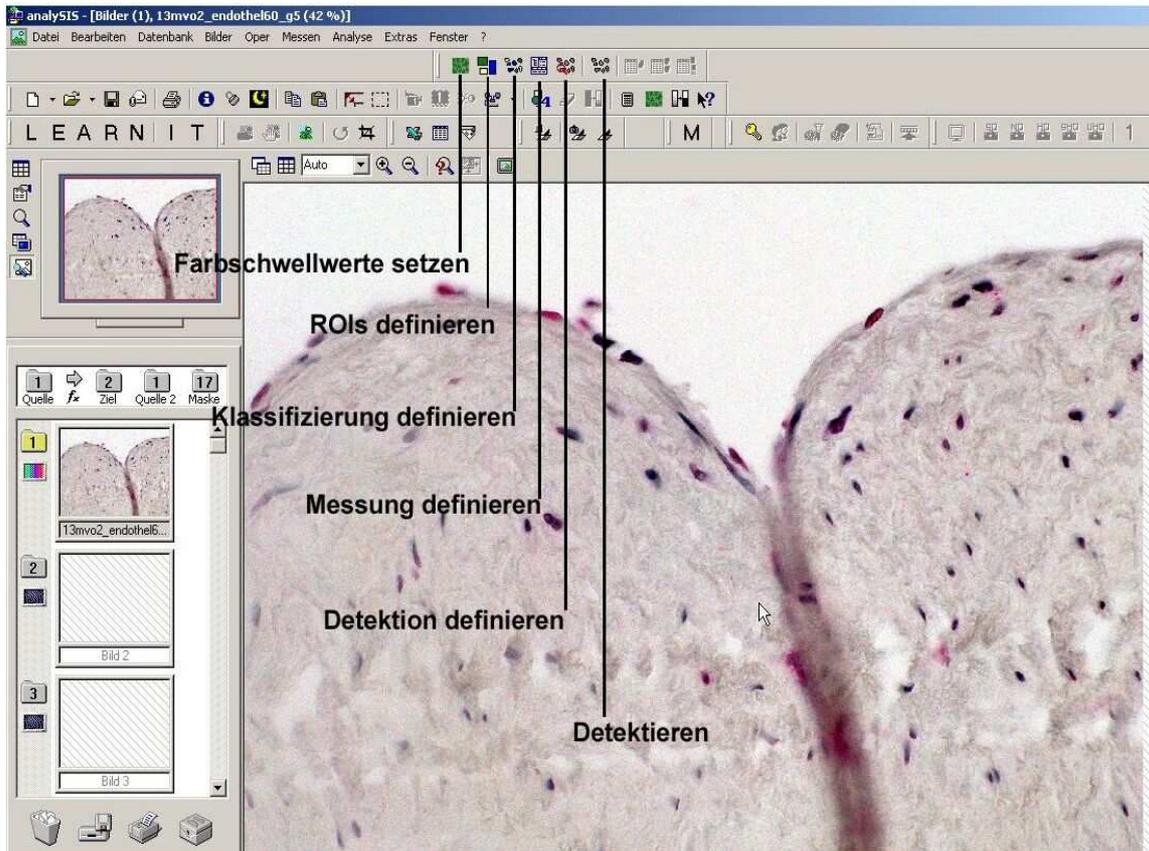


Abbildung 10: Übersichtbild der Bedienungsmaske des Softwareprogramms analyzeSIS® 3.0 mit den einzelnen Einstellungsmöglichkeiten für die Auswertung der Graftproben

7. Literaturverzeichnis

Alamanni F, Parolari A, Visigalli R, Bussolati O, Rubini P, Sala R, Bonati L, Gazzola GC, Biglioli P, Dall'Asta V.

Endothelial cell injury induced by preservation solutions: a confocal microscopy study.
Ann Thorac Surg 2002; 73: 1606-1614

Allaire E, Clowes AW.

Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: The intimal hyperplastic response.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 582-591

Anastasiou N, Allen S, Paniagua R, Chester A, Yacoub M.

Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein.
J Vasc Surg 1997; 25: 713-721

Angelini GD, Bryan AJ, Williams HMJ, Morgan R, Newby AC.

Distension promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short term patency in pig arteriovenous bypass grafts.
J Thorac Cardiovasc Surg 1990; 99: 433-439

Angelini GD, Christie MI, Bryan AJ, Lewis MJ.

Surgical preparation impairs release of endothelium-derived relaxing factor from human saphenous vein.
Ann Thorc Surg 1989; 48: 417-420

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BP, Hall PA.

In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states.
J Pathol 1993; 170: 1-8

Bailey CP, Bolton HE, Likoff W.

The surgical treatment of coronary arterial disease.
Rocky Mt Med J 1953; 50: 946-952

Bando K, Teramoto S, Tago M, Seno S, Murakami T, nawa S, Senso Y.

Oxygenated perfluorocarbon, recombinant human superoxide dismutase, and catalase ameliorate free radical induced myocardial injury during heart preservation and transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 96: 930-938

Barker SG, Talbert A, Cottam S, Baskerville PA, Martin JF.

Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig.
Arterioscler Thromb 1993; 13: 70-77

Barner HB, Fischer VW.

Endothelial preservation in human saphenous veins harvested for coronary grafting.
J Thorac Cardiovasc Surg 1990; 10: 148-149

Barr ML, Nishanian GP, Sakamaki Y, Carey JN, Chang J, Starnes VA.

A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung reperfusion injury.
Transplant Proc 1997; 29: 1357-1358

Bauriedel G, Schmucking I, Hutter R, Luchesi C, Welsch U, Kandolf R, Lüderitz B.

Increased apoptosis and necrosis of coronary plaques in unstable angina.
Z Kardiol 1997; 86: 902-910

Belzer FO, Southard JH.

Principles of solid-organ preservation by cold storage.
Transplantation 1988; 45: 673-676

Bennett MR, Boyle JJ.

Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis.
Atherosclerosis 1998; 138: 3-9

Best PJ, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR Jr, Simari RD, Lerman A.

Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 14-22

Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M.

Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide.
Am J Pathol 1995; 146: 75-85

Bourassa MG.

Fate of venous grafts: the past, the present and the future.
J Am Coll Cardiol 1991; 5: 1081-1083

Boyle JJ.

Vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis.
Int J Exp Path 1999; 80: 197-203

Bruckenberg E.

18. Herzbericht 2005 mit Transplantationschirurgie.
E Bruckenberg Selbstverlag 2006; 55

Bryan AJ, Angelini GD.

The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention.
Curr Opin in Cardiol 1994; 9: 641-649

Bush HL, McCabe ME, Nabseth DC.

Functional injury of vein graft endothelium! Role of hypothermia and distension.
Arch Surg 1984; 119: 770-774

Carrier M, Trudel S, Pelletier LC.

Effect of Celsior and University of Wisconsin solutions on myocardial metabolism and function after warm ischemia.

J Cardiovasc Surg 1999; 40: 811-816

Cavallari G, Catena F, Santoni B, Montalti R, Turi P, Beltempo P, Bertelli R, Piazzese E, Pacile V, Faenza A, Nardo B, Cavallari A.

Kidney preservation in pigs with University of Wisconsin and Celsior solution.

Minerva Chir 2002; 57: 295-300

Chesebro JH, Fuster V.

Platelet-inhibitor drugs before and after coronary artery bypass surgery and coronary angioplasty: the basis of their use, data from animal studies, clinical trial data, and current recommendations.

Cardiology 1986; 73: 292-305

Cho A, Mitchell L, Koopmanns D, Langille BL.

Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits.

Circ Res 1997; 81: 328-337

Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI.

Stranger in a Strange land: The pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries.

Progress in Cardiovasc Dis 1991; 34: 45-68

Collins RJ, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JF.

Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis.

Int J Radiat Biol 1992; 61: 451-453

Compton MM.

A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome.

Cancer Metastasis Rev 1992; 11: 105-119

Cross HR, Opie LH, Radda GK, Clarke K.

Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved.

Circ Res 1996; 78: 482-491

Davies MG, Hagen P-O.

The vascular endothelium: a new horizon.

Ann Surg 1993; 218: 593-609

Davies MG, Hagen P-O.

Pathophysiology of vein graft failure: A review.

Eur J Vasc Endovasc Surg 1995; 9: 7-18

Davies MG, Kim JH, Dalen H, Makhoul RG, Svendsen E, Hagen P-O.
Reduction of experimental vein graft intimal hyperplasia and preservation of nitric oxide-mediated relaxation by the nitric oxide precursor L-arginine.
Surgery 1994; 116: 557-568

Davies MG, Klyachkin ML, Dalen H, Massey M, Svendsen E, Hagen P-O.
The integrity of experimental vein graft endothelium: implications on the etiology of early graft failure.
Eur J Vasc Surg 1993; 7: 156-165

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannichal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK.
Nitric oxide decrease cytokine induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines.
J Clin Invest 1995; 96: 60-68

Dibbert B, Simon HU.
The molecular mechanism of apoptosis.
DMW 1997; 122: 523-526

Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ.
A review of the histologic changes in vein-to-artery grafts, with particular reference to intimal hyperplasia.
Arch Surg 1988; 123: 691-696

Dilley RJ, McGeachie JK, Tennant M.
Vein to artery grafts: a morphological and histochemical study of the histogenesis of intimal hyperplasia.
Aust N Z J Surg 1992; 62: 297-303

Drinkwater DC Jr, Ziv ET, Laks H, Lee JR, Bhuta S, Rudis E, Chang P.
Extracellular and standard University of Wisconsin solutions provide equivalent preservation of myocardial function.
J Thorac Cardiosurg 1995; 110: 738-745

Eastman A, Barry MA.
The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis?
Cancer Invest 1992; 10: 229-240

Faulkner SL, Fisher RD, Conkle DM, Page DL, Bender HW Jr.
Effects of blood flow rate on subendothelial proliferation in venous autografts used as arterial substitutes.
Circulation 1975; 52: 1163-1172

Favaloro RG.
Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease: operative technique.
J Thorac Cardiovasc Surg 1969; 58: 178-185

Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper D, Burton JR.
Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years.
J Am Coll Cardiol 1996; 28: 616-626

Fox J, Shanley J.
Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells.
J Biol Chem 1996; 271: 12578-12584

Garlicki M.
May preservation solution affect the incidence of graft vasculopathy in a transplanted heart?
Ann Trans 2003; 1: 19-24

Garrett HE, Cartmill TB, Thiele JP, Howell JF, De Bakey ME.
Experimental evaluation of venous autografts as aorta to left ventricular myocardial shunts in revascularization of the heart: a preliminary report.
Cardiovasc Res Cent Bull 1964; 24: 15-20

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.
The J of Cell Biology 1992; 119: 493-501

Gibbon JH, Jr.
Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery.
Minn Med 1954; 37: 171-185.

Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hannsson G.K, Libby P.
Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 19-27.

Gottlob R.
The preservation of the venous endothelium by a dissection without touching and by an atraumatic technique of vascular anastomosis. The importance for arterial and venous surgery.
Minerva Chir 1977; 32: 693-700

Gundry SR, Jones M, Ishikara T, Ferrans VJ.
Intraoperative trauma to human saphenous vein: scanning electron microscopic comparison of preparation techniques.
Ann Thorac Surg 1980; 30: 40-47

Gundry SR, Jones M, Ishikara T, Ferrans VJ.
Optimal preparation techniques for human saphenous veins.
Surgery 1980; 88: 785-794

Hansson GK, Seifert PS, Olson G, Bondjers G.
Immunohistological detection of macrophages and T-lymphocytes in arteriosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits.
Arterioscler Thromb 1991; 11: 745-750

Ip JH, Fuster V, Badimon L, Taubman MB, Chesebro JH.
Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation.
J Am Coll Cardiol 1990; 15: 1667-1687

Junqueira LC, Carneiro J.
Basic Histology.
Lange Medical Book McGraw-Hill 2003; 165-184

Kerr JF.
A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special references to changes in lysosomes.
J Pathol Bacteriol 1965; 90: 419-435

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br J Cancer 1972; 26: 239-257

Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, Meyer de Gry.
RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labelling techniques used to detect apoptosis.
Am J Pathol 1998; 152: 885-888

Kolesov VI.
Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris.
J Thorac Cardiovasc Surg 1967; 54: 535-544

Kukreja RC, Hess ML.
The oxygen free radical system: from equation through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection.
Cardiovasc Res 1992; 26: 641-655

Kumar A, Lindner V.
Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2238-2244

Kurusz M, Christman EW, Derrick JR, Tyers GF, Williams EH.
Use of cardioplegic solution for vein graft distension and preservation: a light and scanning electron microscopic study.
Ann Thorac Surg 1981; 32: 68-74

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A.

TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement.
J Histochem Cytochem 1998; 46: 327-334

Levin S.

A toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues.

Toxicol Pathol 1995; 23: 533-539

Lüscher TF.

Vascular biology of coronary bypass grafts.

Curr Opin Cardiol 1991; 6: 868-876

Menasche P, Hricak B, Pradier F, Cheav SL, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Bloch G, Piwnica A.

Efficacy of lactobionate-enriched cardioplegic solution in preserving compliance of cold – stored heart transplants.

J Heart Lung Transplant 1993; 12: 1053-1061

Menasche P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Weiss M, Piwnica A, Bloch G.

Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution.

Eur J Cardiothorac Surg 1994 ; 8: 207-213

Minor T, Sitzia M, Dombrowski F.

Kidney transplantation from non-heart-beating donors after oxygenated low-flow machine perfusion preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution.

Transpl Int 2005; 17: 707-712

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.

Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142

Moor E, Hamsten A, Blombäck M, Herzfeld I, Wiman B, Ryden L.

Haemostatic factors and inhibitors and coronary artery bypass grafting: preoperative alterations and relations to graft occlusion.

Thromb Haemost 1994; 72: 335-342

Motwani JG, Topol EJ.

Aortocoronary vein graft disease. Pathogenesis, predisposition and prevention.

Circulation 1998; 97: 916-931

Nachman RL, Silverstein R.

Hypercoagulable states.

Ann Intern Med 1993; 119: 819-827

Nguyen HC, Grossi EA, LeBoutillier M 3rd, Steinberg BM, Rifkin DB, Baumann FG, Colvin SB, Galloway AC.

Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors.

Ann Thorac Surg 1994; 58: 308-311

Okada K, Yamashita C, Okada M.

Efficacy of oxygenated University of Wisconsin solution containing endothelin-A receptor antagonist in twenty-four-hour heart preservation.

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 475-484

Perrault LP, El-Hamansy I, Dumont E, Malo O, Carrier M.

Effects of crystalloid, blood and celsior solutions on porcine coronary endothelial function after heart transplantation.

J Heart Lung Transplant 2005; 80: 359-364

Perrault LP, Nickner C, Desjardins N, Dumont E, Thai P, Carrier M.

Improved preservation of coronary endothelial function with Celsior compared with blood and crystalloid solutions in heart transplantation.

J Heart Lung Transplant 2001; 20: 549-558

Pietri S, Culcasi M, Albat B, Alberici G, Menasche P.

Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution Celsior. A hemodynamic and electron spin resonance study.

Transplantation 1994; 58: 739-742

Pollman M, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons G.

Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II.

Circ Res 1996; 79: 748-756

Rao GN, Berk BC.

Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression.

Circ Res 1992; 70: 593-599

Ratliff NB and Myles JL.

Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts. Possible immune-mediated disease.

Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 772-776

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.

Nature 1993; 362: 801-809

Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J, Wolitzky BA, Norton C, Plocinski J, Benjamin W.

Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface.

J Clin Invest 1992; 90: 2333-2339

Shuhaiber JH, Evans AN, Massad MG, Geha AS.

Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery.

Eur J of Cardiothoracic Surg 2002; 22: 387-396

Solberg S, Larsen T, Jørgensen L, Sørli D.

Cold induced endothelial cell detachment in human saphenous vein grafts.

J Cardiovasc surg 1987; 28: 571-575

Solberg S, Larsen T, Smabrekke A, Brox JH, Bertheussen K, Sørli D, Osterud B, Jørgensen L.

A new protective solution for hypothermic storage of free vein grafts in cardiovascular surgery.

Scand J Clin Lab Invest 1992; 52: 73-82

Spray TL, Roberts WC.

Status of the grafts and the native coronary arteries proximal and distal to coronary anastomotic sites of aortocoronary bypass grafts.

Circulation 1977; 55: 741-749

Stanley JC, Ernst CB, Fry WJ.

Fate of 100 aortorenal vein grafts: Characteristics of late graft expansion, aneurysmal dilatation, and stenosis.

Surgery 1973; 74: 931-944

Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.

A definition of the intima of human arteries and its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Circulation 1992; 85: 391-405

Steller H.

Mechanisms and genes of cellular suicide.

Science 1995; 267: 1445-1449

te Velthuis H, Jansen PGM, Oudemans-van-Straaten HM, van Kamp GJ, Sturk A, Eijssman L, Wildevuur CR.

Circulating endothelin in cardiac operations: influence of blood pressure and endotoxin.

Ann Thorac Surg 1996; 61: 904-908

Thompson CB.

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.

Science 1995; 267: 1456-1462

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC.

The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis.

Toxicol Pathol 1997; 25: 82-88

Tsutsumi H, Takeyoshi I, Oshima K, Mohara J, Aizaki M, Morishita Y.

The effect of coronary perfusion with an oxygenated celsior solution on 12 hour cardiac preservation.

Int J Angiol 2001; 10: 15-19

Verrier ED, Boyle Jr EM.

Endothelial cell injury in cardiovascular surgery.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 915-922

Vineberg AM.

Development of anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery.

J Thorac Surg 1949; 18: 839-850

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, Dierendonck JH.

A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA.

J Histochem Cytochem 1993; 41: 7-12

Wilson YG, Davies AH, Southgate K, Currie IC, Sheffield E, Baird, RN, Lamont PM, Angelini GD.

Vein quality influences neointima hyperplasia in an organ culture model of human saphenous vein.

Eur J Vasc Endovasc Surg 1997; 13: 557-562

Yang Z, Ruschitzka F, Rabelink TJ, Noll G, Julmy F, Joch H, Gafner V, Aleksic I, Althaus U, Lüscher TF.

Different effects of thrombin receptor activation on endothelium and smooth muscle cells of human coronary bypass vessels. Implications for venous bypass graft failure.

Circulation 1997; 95: 1870-1876

Zamai C, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M.

Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation.

Cytometry 1996; 23: 303-311

Zhu H, Fearnhead HO, Cohen GM.

An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP. 1 cells.

FEBS Lett 1995; 374: 303-308

Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. J. Preuße für die Überlassung dieser Arbeit.

Für die wissenschaftliche Betreuung, die tatkräftige Unterstützung und die konstruktive Kritik bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich besonders den Herren Dr. med. C. Nill und Dr. med. K. Winkler.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Frau C. Peigney für die tatkräftige Unterstützung im herzchirurgischen Labor bedanken.

Zuletzt danke ich herzlich der Familie Küpper, die diese Arbeit gewissenhaft lektoriert hat.