

Aus der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. O. Ewert

Ultrastrukturelle Endothelveränderungen bei unterschiedlich
konservierten Venentransplantaten - Konsequenzen für die Praxis

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Saskia Finster
aus Amberg

Würzburg, Januar 2005

Referent: Prof. Dr. med. O. Eiert
Korreferent: Prof. Dr. med. J.G. Müller
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

	SEITE
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Bedeutung des Endothels	4
1.3 Problematik des Graftverschlusses	6
1.4 Fragestellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Patientengut	9
2.2 Versuchsablauf	9
2.2.1 Operationsablauf und Probengewinnung	9
2.2.2 Venenpräparation und -lagerung	10
2.3 Untersuchungsmethoden	12
2.3.1 Rasterelektronenmikroskopie	12
2.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie	13
2.3.3 Immunhistochemie	15
2.4 Auswertung	15
2.4.1 Allgemeines	15
2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Rasterelektronenmikroskopie	18
3.1.1 Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie nach der Punktgittermethode nach Weibel	18
3.1.2 Semiquantitative Auswertung des Endothelzellschadens	19

3.1.3 Morphologische Beschreibung	22
3.2 Transmissionselektronenmikroskopie	31
3.3 Immunhistochemie	32
4. Diskussion	33
5. Schlussfolgerung aus den Ergebnissen	38
6. Zusammenfassung	39
7. Literaturverzeichnis	41

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einführung

Die koronare Herzerkrankung stellt eine häufige Erkrankung der Menschen in den Industrienationen dar. Für einen Teil der Patienten, mit einer Mehrgefäßerkrankung oder Hauptstammstenose, liegt die einzige mortalitätssenkende Therapieoption in der aortokoronaren Bypassoperation. Als Standardverfahren erfolgt die Überbrückung der Koronarstenosen mit einem autologen Beinveneninterponat der V. saphena magna. Zur Revaskularisierung des R. interventricularis anterior wird hauptsächlich die linke A. mammaria interna als "in-situ-Graft" verwendet (14). Der unmittelbare Erfolg wie auch die Langzeitresultate des aortokoronaren Venenbypasses werden durch das Fortschreiten der koronaren Herzkrankheit und damit die Stenosierung resp. den Verschluss der Bypassgefäße belastet (14, 19, 43), die Überbrückung der Stenose mittels eines Gefäßinterponates stellt in dieser Hinsicht nur eine palliative Versorgung dar (14, 42). Gleichzeitig reduziert die Beschädigung des Venenmaterials (43), u.a. bedingt durch die intraoperative Lagerung der Gefäße, die Haltbarkeit des Venengrafts. Somit sind gute Langzeitergebnisse, die sich in fehlender Angina pectoris-Symptomatik und in der Vermeidung von Reinfarkten und Reoperationen zeigen, nicht selbstverständlich (8, 14, 29). Den Bemühungen, die Verschlussraten der transplantierten Gefäße möglichst niedrig zu halten, kommt daher eine große Bedeutung zu.

Die Möglichkeit, stenosierende Prozesse der Koronarien mit Veneninterponaten der V. saphena magna zu behandeln, wurde 1967 in Cleveland/ USA durch Favalaro und Effler (15, 16) als Therapieoption der koronaren Herzerkrankung eingeführt. Seitdem hat sich die

aortokoronare Bypassoperation zu einer der häufigsten angewandten Operation am Herzen etabliert. Allein in Deutschland wird jährlich bei 71215 Patienten (2002)(35) eine Bypassoperation durchgeführt, davon in Würzburg ca. 600. Zwar hat es auf diesem Gebiet schon zahlreiche Weiterentwicklungen gegeben, wie zum Beispiel die Einführung der "No-touch"-Technik bei der Venenentnahme (16), doch stellen Stenose und Verschluss der Venengrafts weiterhin ein großes Problem hinsichtlich des Langzeitresultates dar (3, 14, 30). Der Erfolg dieser Operation ist maßgeblich von der Durchgängigkeit der Venengrafts abhängig. Thrombosierung (3, 9, 14, 38, 39, 43) ist eine der Hauptursachen des frühen Graftverschlusses, Gründe für den späten sind Intimahyperplasie und Atherosklerose (3, 6, 9, 12, 14, 30, 33, 38). Die Frühthromboserate der Venengrafts liegt zwischen 8 bis 18% (29) im ersten Jahr postoperativ, die möglicherweise durch technischen Problemen (6, 12), schlechte Anastomosenqualität und v.a. durch Beschädigung des Endothels (12, 14, 41) verursacht wird, insbesondere da Endothelschäden als wichtigster Initiationsfaktor für die Proliferation der Intima und der Entwicklung atheromatöser Veränderungen erkannt wurden. Die Venenentnahme und Lagerung führt zu mechanischer, chemischer und ischämischer Verletzung der Gefäßwände und daher zur Triggerung des Entstehens pathologischer Gefäßveränderungen (6, 12).

Das Endothel unterliegt vielen schädigenden Einflüssen während der Venenpräparation und -entnahme, begründet durch die intraluminalen Druckerhöhung während der Spülung zur Beseitigung von Blutresten und Suche nach Leckagen, sowie durch die unter Umständen ungeeignete Auswahl der Lagerungslösung bzw. -bedingungen (2-4, 11, 21, 25, 37, 43, 45). Die Integrität der endothelialen Auskleidung der Gefäße sollte unbedingt erhalten bleiben, da das Endothel der Gefäßwand eine bedeutende Rolle in der vasomotorischen Regulation des Gefäßtonus,

der Modulation der antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften, sowie der Aufrechterhaltung der Architektur spielt (10, 12, 28). Endothelzellen produzieren wichtige Vasoregulatoren wie Prostazyklin und EDRF (10). Nur ein intaktes Endothel vermag eine optimale nonthrombogene Oberfläche zu schaffen und einen Beitrag zur Vasoregulation zu leisten (10, 25).

Ein ideales Medium zur Venenlagerung sollte daher Endothelzellen und glatten Muskelzellen schützen, indem chemische und ischämische Schäden begrenzt werden (6). Bisher besteht jedoch kein einheitlicher Konsens darüber, welches Medium diese Kriterien erfüllt und die Endothelmorphologie und -funktion erhält (3, 43, 45). Viele Autoren empfehlen heparinisertes Eigenblut als Lagerungslösung der Venentransplantate so Bush et al. (4), Zerkowski et al. (43) und Wagner et al. (38, 39). Hingegen beobachtete Cavallari et al. (6) bei Eigenblutlagerung, genau wie unter physiologischer Kochsalzlösung eine Beschädigung der glatten Muskelzellen mit Reduktion deren Kontraktilität. Darüber hinaus stellten Davies und Kollegen (12) bei einer Grafflagerung in 0,9%igem NaCl eine erhöhte Intimahyperplasie fest.

In vielen Studien wurden die negativen Auswirkungen unphysiologisch hoher Drücke auf das Endothel untersucht (21, 22, 31), weniger Beachtung wurde hingegen der potentiellen Schädigung durch das Inkubationsmedium geschenkt. Die vorliegende Arbeit demonstriert die Bedeutung der Inkubationslösung bezüglich der histologischen endothelialen Integrität. Ziel der Studie ist es, die Unterschiede der Endothelzellmorphologie nach Lagerung von Venengrafts in 0,9%igem NaCl bzw. in Zellkulturmedium mit Albumin aufzuzeigen. Zur Dokumentation der Zellveränderungen wurden die Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie wie auch immunhistochemische

Färbemethoden verwendet. Um eine bestmögliche Konservierung des Endothels zu erhalten, wird es nötig sein, die herkömmlichen Lagerungslösungen zu modifizieren.

1.2 Bedeutung des Endothels

Endothelmorphologie

Die innere Auskleidung aller Blutgefäße des menschlichen Körpers besteht aus einer einschichtigen, dünnen Lage rhomboidförmiger Zellen (11), dem Endothel, das die wichtigste Kommunikationsstruktur zwischen Blut und Gefäßwand darstellt (23). Beim Erwachsenen beträgt die Endothelmasse ca. 1% seiner Körpermasse, bei einer Fläche von ca. 5000 m²(11). Zwischen venösen und arteriellen Blutgefäßen existieren wesentliche Unterschiede des Endothels. Beispielsweise sind Endothelzellen in arteriellen Gefäßen mit ihrer Längsachse in Richtung des Blutflusses ausgerichtet, in Venen dagegen bilden sie ein polygonales Muster (11, 13). Auch weicht die arterielle von der venösen Größe ab, im venösen Stromgebiet sind die Endothelzellen größer, aber flacher (9).

Endothelfunktion

Das Endothel ist ein metabolisch hochaktives Organ, bildet mit dem darunterliegenden Subendothel eine relativ impermeable Schicht (11), dient als Barriere zwischen Blutstrom und Gefäßwand (23, 45) und moduliert Gefäßpermeabilität und -architektur (11, 28). Gesunde Endothelzellen besitzen gerinnungshemmende, antithrombotische und fibrinolytische Eigenschaften (28), die die Adhärenz von Blutzellen, wie Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten an die Gefäßwand

verhindern (23, 45), wodurch sie zur Aufrechterhaltung des laminaren Blutflusses beitragen (11, 23).

Die Regulation und Kontrolle des Gefäßtonus ist eine bedeutende Aufgabe intakten endothelialen Gewebes. Endothelzellen bilden aus der Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase kontinuierlich vasodilatatorisches Stickstoffmonoxid (= NO), das glatte Muskelzellen relaxiert (11, 23, 28). Störungen in der Endothelzellfunktion vermindern die Freisetzung von NO und so die Vasodilatation (32). Daneben spielt NO eine Rolle bei der Vermeidung der Thrombozytenaktivierung und -adhäsion (11, 28). Durch intaktes Endothel werden weiterhin vasodilatierende Prostaglandine freigesetzt wie z.B. Prostazyklin. Prostazyklin induziert eine Vasodilatation und inhibiert die Thrombozytenaggregation (20). Defekte Endothelzellen können aber auch Vasokonstriktoren, v.a. Endothelin und Thromboxan, sezernieren (11, 23, 32). Darüber hinaus regulieren Endothelzellen die Proliferation glatter Muskelzellen über verschiedene Wachstumsfaktoren, wie platelet derived growth factor und insulin like growth factor (11), und sind an Entzündungs- und Immunkaskaden beteiligt (11). Die Sekretion endothelialer Produkte kann sowohl in den Blutstrom als auch parakrin in die Gefäßwand erfolgen(23).

Unter pathologischen Bedingungen sind viele endotheliale Funktionen und Reaktionen verändert. In erster Linie ist die Freisetzung vasodilatierender Substanzen, v.a. NO, betroffen (23). Bei Vorliegen einer defekten endothelialen Schicht überwiegt die Wirkung vasokonstringierender Substanzen die der vasodilatierenden (45). Endothelzellverletzung ist das initierende Ereignis bei der Entstehung der Atherosklerose (11). Defektes Endothel ist daher durch Thrombose, Vasospasmus und Atherosklerose maßgeblich am Graffversagen beteiligt.

1.3 Problematik des Graffverschlusses

Der Verschluss der transplantierten venösen Bypassgefäße stellt eine enorme klinische und ökonomische Herausforderung dar: das Graffversagen liegt im ersten Jahr postoperativ bei 8 - 18%, im folgenden bei 2% jährlich (29). In den arterialisierten venösen Transplantaten zeigt sich ab dem 5. Jahr postoperativ eine zunehmende Atherosklerose (14). Dadurch steigt die Spätverschlussrate auf 50% der Bypassgefäße bis zum 10. postoperativen Jahr. Ursache des Frühverschlusses ist die Thrombosierung der transplantierten Gefäße (4, 9, 14, 45). Der Hauptgrund des späten Graffverschlusses liegt in der Entwicklung einer Intimahyperplasie und atheromatösen Veränderungen (3, 6, 45). Die universelle Antwort einer Vene auf die Implantation in den arteriellen Kreislauf ist die intimale Hyperplasie (9). Die perioperative Verletzung der Endothelzellen spielt bei deren Beginn, der charakterisiert ist durch die Proliferation glatter Muskelzellen und die Ablagerung von Bindegewebe, eine wichtige Rolle (9).

Das Transplantatversagen, bedingt durch das biologische Schicksal der Graffgefäße, und die zusätzlichen Stenosen durch Progredienz der koronaren Herzkrankheit in den nativen Koronarien erklären die Tatsache, dass allein in Deutschland im Jahr 2002 6778 Reoperationen (7,1% aller Bypass-OPs)(35) notwendig wurden. Nach 5 Jahren liegt die Reoperationsrate bei 3%, nach 10 Jahren bei 10% und nach 15 Jahren sogar bei 35% (14). Darum gilt es verschiedene Ansätze zu entwickeln, die Langzeitresultate zu verbessern bzw. das Intervall zwischen Erst- und Zweitoperation zu verlängern. Einerseits muss das Fortschreiten der koronaren Herzerkrankung durch allgemeine und medikamentöse Maßnahmen verhindert werden. Andererseits sollten alle Faktoren, die die Integrität der Transplantatgefäße beeinträchtigen, auf ein absolutes Minimum reduziert werden. Die Minimierung des Endothelschadens

verbessert die Kurz- und Langzeitergebnisse der Grafftdurchgängigkeit (45).

Chirurgische Handhabung während der Venenpräparation und -entnahme, intraluminale Druckerhöhung im Rahmen der Beseitigung von Blutresten und Suche nach Leckagen, Wahl der Inkubationslösung und -temperatur (2, 4, 7, 21, 22, 37) repräsentieren die schädigenden Einflüsse auf das Venenmaterial und v.a. das Endothel. Besonders das Inkubationsmedium zur Zwischenlagerung der Transplantate bis zur Implantation als Koronararterienersatz stellt eine potentielle Quelle zur Schädigung der Venen dar (2). Davies et al. (11) bestätigten, dass der Grad der Venengrafftverletzung während der Entnahme, Lagerung und Implantation mit der späteren Entwicklung einer Intimahyperplasie korreliert. Dass der Charakter der Lösung und die Dauer der Lagerung, der pH-Wert und die Temperatur Auswirkungen auf die Gefäße haben, ist allgemein akzeptiert. Allerdings führten die anhaltenden Diskussionen bezüglich der optimalen Lagerungslösung bisher zu keinem Konsens (43, 45).

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die Langzeitergebnisse der Koronarchirurgie zu verbessern. Einen Ansatz dazu stellt die Verwendung arterieller statt venöser Grafts dar. Zur Revaskularisierung des R. descendens anterior steht ein "in situ" Grafft der linken A. mammaria interna ebenso zur Verfügung (14), wie die Arteria radialis (1, 24) und die Arteria gastroepiploica (26). Diese bei im Vergleich erhöhtem Verschlussrisiko (34) bevorzugt als Grafftmaterial zur A. circumflexa respektive der rechten Koronararterie. Thrombose als Frühkomplikation droht sowohl arteriellen, als auch venösen Grafts, arterielle Bypassgefäße unterliegen aber nicht den oben genannten Spätveränderungen (11, 14) und verfügen somit über bessere langfristige Offenheitsraten (3, 9, 14). Allerdings ist die A. mammaria interna in ihrer Anwendbarkeit beschränkt, da pro Patient nur zwei kurze Gefäßsegmente verfügbar sind (9). Das

Vorherrschen multipler Graftingverfahren, die technisch einfache Verfügbarkeit und Handhabung der V. saphena magna und der steigende Bedarf an Wiederholungseingriffen hat zur Folge, dass die V. saphena magna ihre Hauptrolle als Conduit in der Bypasschirurgie behalten wird (3). Somit ist es besonders wichtig, vermehrt Forschungsanstrengungen auf die Verbesserung der Endothelkonservierung und damit auf erhöhte Graftdurchgängigkeit zu richten.

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, morphologische Veränderungen an Venengrafts nach Lagerung in verschiedenen Inkubationsmedien, der bisher verwendeten physiologischen Kochsalzlösung und Zellkulturmedien mit unterschiedlichem hohem Gehalt an Albumin nachzuweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut

In der vorliegenden Untersuchung werden Segmente der V. saphena magna von sechs männlichen Patienten verwendet, die sich einer elektiven aortocoronaren Bypassoperation unterziehen. Ihr Alter liegt zwischen 60 und 70 Jahren, Durchschnittsalter 68. Alle Patienten sind über die Operation und die dabei erfolgende zusätzliche Entnahme von Venenmaterial für Versuchszwecke aufgeklärt und geben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Patienten werden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: max. dreifacher ACVB, keine wesentlichen Nebenerkrankungen, keine Varikosis, männliches Geschlecht, Elektiveingriffe.

2.2 Versuchsablauf

2.2.1 Operationsablauf und Probengewinnung

Die aortocoronare Venenbypassoperation verläuft nach dem üblichen Schema für herzchirurgische Eingriffe. Zur präoperativen Thromboseprophylaxe erhält der Patient 3x 7500 I.E. Calciparin[®] s.c.. Unmittelbar vor der Operation wird der Patient vom Jugulum bis in die Leistenregion und komplett an beiden Beinen rasiert. Die Narkoseeinleitung erfolgt nach dem üblichen Standard. Über eine mediane Längssternotomie wird der Thorax des Patienten eröffnet, anschließend erfolgt die Eröffnung des Herzbeutels und der Anschluss der Herz-Lungen-Maschine nach systemischer Heparin[®]-gabe (300 I.E. Heparin/kg KG i.v.). Die Aorta ascendens wird quer abgeklemmt und

eine Blutkardioplegie durchgeführt. Es folgt die Abkühlung der Körpertemperatur auf 28-30°C rektal. Gleichzeitig wird die als Transplantat verwendete V. saphena magna durch ein zweites Operationsteam freipräpariert. Nach Explantation der Vene sind ca. 100 ml steriles, physiologisches Kochsalz bei 21°C zur Zwischenlagerung und Reinigung des Grafts nötig. Über eine mit 0,9%igem NaCl gefüllten Spritze wird die Vene vorsichtig aufdehnt und gereinigt. Unterdessen werden die entsprechenden Herzkranzgefäße aufgesucht, distal der Stenose inzidiert und sondiert. Die distale Anastomose des Venengrafts wird im Herzstillstand eingenäht, die Naht der proximalen Anastomose erfolgt am schlagenden Herzen. Nach Beendigung der Operation erhält der Patient zur Neutralisierung des Heparins Protaminsulfat.

Für unsere Versuchsreihe wird im Rahmen routinemäßigen Bypassoperationen Venenmaterial der distalen V. saphena magna entnommen. Die Freipräparation der V. saphena magna erfolgt immer unter denselben standardisierten Bedingungen, d.h. jedes Mal durch denselben Operateur und unter Einhaltung der „no-touch“- Technik. Das Venenmaterial, das für die Erstellung des Bypasses nicht benötigt wird, wird für die Versuchszwecke zur Verfügung gestellt. Der Transport des ca. 7 cm langen Venensegmentes in PBS (phosphate buffered solution) erfolgt unverzüglich zum Versuchslabor und nimmt nie länger als fünf Minuten in Anspruch.

2.2.2 Venenpräparation und -lagerung

Nach dem Transport wird die Vene sofort auf einer angefeuchteten Korkplatte gelagert und dort unter ständiger Befeuchtung, jeweils mit

PBS, ohne weitere Manipulation präpariert. Die Präparation erfolgt nach festgelegtem Schema: zuerst Längsincision des Venenrohres und Aufklappen mit anschließender Befestigung der Venenplatte mittels Stecknadeln auf dem Kork und Zerschneiden der Vene in drei Segmente, die ihrerseits ebenso auf dem Kork befestigt werden. Die Venensegmente werden für 45 Minuten mit drei verschiedenen Lagerungslösungen bei 21 °C inkubiert. Als Inkubationsmedien werden verwendet :

- 1) Kontrollgruppe: unmittelbare Fixation des Segmentes für Rasterelektronenmikroskopie
- 2) Medium 199 (Gibco BRL[®]) + 20 mM HEPES + 5% BSA (bovines Serumalbumin)
- 3) Medium 199 (Gibco BRL[®]) + 20 mM HEPES + 20% HSP (humanes Serumprotein)
- 4) 4 0,9%iges Kochsalz der Firma Fresenius[®]

Nach der Inkubation erfolgt eine nochmalige Teilung jedes Segments für die unterschiedlichen Untersuchungen. Zwei Venensegmente werden sofort in 2,5%igem Glutaraldehyd für die Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie fixiert, um einen Autolyseprozess des Gewebes und seine Austrocknung zu vermeiden, ein weiteres in Tissuetek für ca. fünf Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für die Immunhistochemie tiefgefroren. Erst nach Fixierung werden Schnittränder und Nadeleinstiche am Probenrand entfernt, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

2.3 Untersuchungsmethoden

2.3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Das seit 1965 auf dem Markt befindliche Rasterelektronenmikroskop eignet sich aus mehreren Gründen besonders gut zur Untersuchung der Venengrafts. Die rasterelektronischen Verfahren ermöglichen die Betrachtung der Oberfläche ganzer Proben und geben einen Überblick über den Zustand und die Intaktheit des Endothels. Das Rasterelektronenmikroskop verfügt über ein hohes Auflösungsvermögen und eine große Schärfentiefe, d.h. es kann auf eine relativ dicke Probenschicht gleichzeitig scharf eingestellt werden (18).

Folgende Voraussetzungen müssen die Proben erfüllen, um zu einem einwandfreien rasterelektronenmikroskopischen Bild führen zu können: „die Proben müssen frei von Wasser, Lösungsmitteln oder anderen Stoffen sein, die im Vakuum gasen und die Säule verunreinigen oder Vakuumprobleme verursachen können. Sie müssen sicher montiert werden und elektrisch leitend sein.“ (18). Da bei den Venensegmenten diese drei Kriterien nicht erfüllt sind, müssen die Proben einer besonderen Weiterverarbeitung unterzogen werden (18). Aus der jeweiligen Inkubationslösung entnommen werden die Proben direkt mit 2,5%igem Glutardaldehyd für max. 72 h fixiert, dabei ist im Gegensatz zur Probenpräparation für das TEM eine Sekundärfixierung mit Osmiumtetroxid nicht nötig (18). Danach wird das Gewebe für zweimal zehn Minuten mit 0,1M Phosphatpuffer ausgewaschen. Eine Entwässerung der Proben mit Aceton ist nötig, um das Wasser zu entfernen, das in Fixier- und Lösungsmitteln enthalten ist und sich nicht mit dem bei der kritischen Punkttrocknung verwendeten flüssigen CO₂ mischt (18). Die Proben werden in einer aufsteigenden Acetonreihe von 30%, 50%, 70 % und 90%igem Aceton in Aqua dest. für jeweils 30 Minuten

bei Raumtemperatur ausgewaschen. Es schließt sich ein fünffaches Auswaschen in 100%igem Aceton für jeweils zehn Minuten an. In reinem Aceton muss das Gewebe mindestens noch einmal über Nacht verweilen, kann so aber auch längere Zeit aufbewahrt werden.

Der nächste Schritt ist die kritische Punkttrocknung¹, um die Probe ohne Oberflächenspannung trocknen zu können (18). Bei dieser Methode wird wasserfreies Aceton in mehreren Schritten gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht. Nach Einbringen der Gewebeprobe in die Apparatur zum Trocknen am kritischen Punkt wird die Kammer auf 5°C abgekühlt, um ein Flüssigbleiben des CO₂ beim Einfüllen in die Kammer sicherzustellen (18). Um das flüssige CO₂ sukzessiv gegen das Aceton in der Venenprobe zu ersetzen, wird die Kammer achtmal mit flüssigem CO₂ durchspült. Es folgt eine Erwärmungsphase auf 45°C mit Druckanstieg bis 90 bar, wobei der kritische Punkt bei 31°C und 75 bar erreicht ist und das flüssige CO₂ in die Gasphase übergeht. Das Gas wird langsam abgelassen und der Druckabbau in der Kammer erstreckt sich über eineinhalb bis zwei Stunden. Dem schließt sich die Beschichtung der Probe mit Gold² an, um die Oberfläche des Venenmaterials leitend zu machen und eine Aufladung im Rasterelektronenmikroskop³ zu verhindern.

2.3.2 Transmissionselektronenmikroskop

Wie auch für das REM ist für die Transmissionselektronenmikroskopie⁴ eine Probenaufbereitung nötig. Proben einer maximalen Kantenlänge von 1mm werden zur Vermeidung von Autolyseprozessen angefertigt. Die chemische Fixierung verläuft zweistufig, bestehend aus 2,5%igem Glutaraldehyd und 2%igem Osmiumtetroxid. Durch die Primärfixierung mit

¹ critical point dryer der Firma BAL-TEC CPD 030

² Sputter der Firma BAL-TEC

³ Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss DSM 926

⁴ Transmissionselektronenmikroskop EM 10 Zeiss

Glutaraldehyd (Stunden oder Tage) entstehen vernetzte Komplexe (Polymere) mit Proteinen, gelöstes als auch membrangebundenen, und Glykogen(18). Vor der Sekundärfixierung mit Osmiumtetroxid für eineinhalb bis zwei Stunden bei 4°C wird das Gewebe in 0,1 M Phosphatpuffer für zehn Minuten gewaschen. Osmiumtetroxid dient der Vernetzung von Lipiden und anderen Molekülen, um einer Extraktion bei folgender Dehydrierung entgegenzuwirken (18). Das Auswaschen in 0,1 M Phosphatpuffer für zehn Minuten soll eine Änderung des pH-Wertes verhindern (18). Das Venenmaterial wird mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu werden große Abstufungen von 50%, 70% und 90%igem Alkohol verwendet, worin die Proben zuerst für zweimal zehn Minuten bei Raumtemperatur entwässert werden, dann folgt noch ein Auswaschen in 100%ig vergälltem und in 100%ig reinem Alkohol für jeweils 15 Minuten. Der Entwässerung folgt das Tränken der Gewebeproben mit Kunstharz und die Einbettung: 2x 15 min Propylenoxid (1,2 Epoxypropan), 1x1 h Propylenoxid-Epon-Gemisch (1:1) und 1x über Nacht in Epon. Anschließend wird das Material in 0,5 cm³ große Gelatine kapseln gegossen und für zwei Tage bei 60°C polymerisiert. Der nächste Schritt der Probenpräparation besteht in der Anfertigung von Ultradünnschnitten. Zuerst werden die Blöcke mit einer Fräse getrimmt, für Ultradünnschnitte ist ein Nachtrimmen mit der Rasierklinge nötig. Semidünnschnitte werden zur Kontrolle angefertigt und mit Giemsa angefärbt. Es werden Ultradünnschnitte von ca. 70-90 nm mit dem Ultramikrotom¹ geschnitten und diese auf Kupfer-Rhodium-Netzen aufgebracht. Vor dem Mikroskopieren erfolgt noch eine Färbung der Schnitte für zehn Minuten mit gesättigtem, wässrigem Urenylacetat, dann Spülen mit destilliertem Wasser und zehn minütiges Färben mit Bleicitrat nach Reynolds.

¹ Ultramikrotom von Reichert UM O2

2.3.3 Immunhistochemie

Die indirekte Immunhistochemie wird mit Primärantikörpern gegen CD 34, PECAM und Faktor VIII durchgeführt. Die Reaktionen wurden freundlicherweise im Pathologischen Institut der Universität Würzburg (Prof. Dämmrich) entsprechend Standardprotokollen durchgeführt. Aus den in Tissue Tek® schockgefrorenen Gewebsegmenten werden Gefrierschnitte hergestellt, die dann mit den obengenannten Antikörpern gefärbt werden. Die Gewebsschnitte werden für zehn Minuten in Aceton fixiert und anschließend im Kryostat/ Aceton für 15 Minuten lang getrocknet. Nach dreimaligem Auswaschen in Tris-NaCl werden die Proben mit Erstantikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgt nach dem Waschen die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 30 Minuten, dasselbe Verfahren wird für den Drittantikörper angewandt.

Nach Antikörperinkubation werden die Proben in PBS gestellt und für die DAB-Reaktion zehn Minuten inkubiert, daran schließt sich ein Auswaschen mit PBS und Aqua dest. an. Die Gewebsschnitte werden zwischen drei und zehn Minuten mit Haemalaun gefärbt und unter fließendem Wasser 15 Minuten gespült. Vor dem Eindecken der Objektträger mit Kaisers Glyzeringelatine folgt ein nochmaliges Auswaschen mit Aqua dest..

2.4 Auswertung

2.4.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Beurteilung der Endothelmorphologie durch die Rasterelektronenmikroskopie gelegt. Mit dieser Methode ist die endotheliale Oberfläche der Venenpräparate

gut beurteilbar. Bezüglich des Vorhandenseins bzw. Verlustes von Endothelzellen sowie deren Oberflächenmorphologie (Dissoziation, Ausstülpungen, Auflagerungen etc.) weist die Rasterelektronenmikroskopie eine hohe Aussagekraft auf. Dabei ist jedoch nachteilig, dass intrazelluläre Komponenten wie Zellkerne, Mitochondrien, Zytoskelett etc. sich der Bewertung entziehen. Um die darunterliegenden Schichten mitzubeurteilen, wurden exemplarisch in einigen Versuchen die Venenpräparate mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Weiterhin wurden beispielhaft bei bestimmten Venensegmenten immunhistochemische Färbemethoden angewandt, um die Zellen sicher als Endothelzellen zu typisieren.

Die Versuchsbedingungen wurden so ausgearbeitet, dass sie möglichst der aktuellen klinischen Handhabung des Venenmaterials während der Bypasschirurgie entsprechen. So wurde als Temperatur der Inkubationsmedien Raumtemperatur gewählt, was den Operationsbedingungen entspricht. Es wurde in dieser Studie eine Inkubationsdauer von 45 Minuten bestimmt, die der intraoperativen Zeitspanne von der Venenentnahme bis zur Implantation in den Koronarkreislauf entspricht.

2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Beurteilung der rasterelektronenmikroskopischen Photographien wurden zwei verschiedene Systeme zur Quantifizierung des Endothelzellschadens verwendet: die Punktgittermethode nach Weibel (36, 40) und ein Score in Anlehnung an Bush und Gundry.

Für die Punktgittermethode nach Weibel wurde ein transparentes Testgitter jeweils für die 1000- bzw. die 1800-fache Vergrößerung

entworfen, das auf die Aufnahmen gelegt wurde. Hierbei wurde für die 1000-fache Vergrößerung 121 Punkte und für die 1800-fache Vergrößerung 36 Punkte (entspricht jeweils einer untersuchten Fläche von $10 \times 15 \mu\text{m}$, angepasst an die Dimension der untersuchten Endothelzellen) ausgewertet. Von zwei unabhängigen Untersuchern wurden endotheliale Schäden, wie z.B. Endothelzellverlust, -separation, freiliegendes Binde- oder Kollagengewebe, notiert, wenn ein Testpunkt auf dem Gitter den Zellschaden schneidet. Nach dieser Methode wurden 24 REM-Bilder ausgezählt und für jede Lagerungslösung ein Mittelwert errechnet.

Als weitere Methode, den Endothelschaden semiquantitativ zu erfassen, wurde ein Beurteilungssystem in Anlehnung an Gundry et al. und Bush et al. entwickelt. Folgende Parameter wurden einbezogen, deren Schweregrad jeweils einem Punktesystem zugeordnet wurde:

- Verlust endothelialer Zellverbindungen
- Endothelzellverlust
- freiliegende Basalmembran oder Kollagengewebe
- Auflagerungen

Die Schädigungsparameter wurden in vier Schweregrade auf einer Skala von 0 bis 4 eingeteilt, basierend auf dem Prozentsatz des geschädigten Venenmaterials:

0 Punkte: kein Schaden auf der zu untersuchenden
Endothelzelloberfläche

1 Punkt: < 10% der Endothelzelloberfläche beschädigt

2 Punkte: 10-25% der Endothelzelloberfläche beschädigt

3 Punkte: 25-50% der Endothelzelloberfläche beschädigt

4 Punkte: >50% der Endothelzelloberfläche beschädigt

3. Ergebnisse

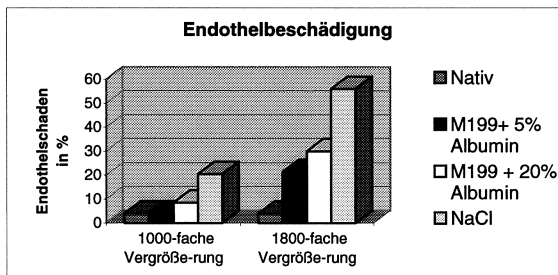
3.1 Rasterelektronenmikroskopie

3.1.1 Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie mittels Punktgittermethode nach Weibel

Die Quantifizierung des Endothelzellschadens durch die Punktgittermethode nach Weibel erbrachte unter 1000-facher Vergrößerung 20,5% Endothelverlust nach 45-minütiger Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung. Nach Lagerung in Medium M199 mit 20%igem Albumin war bei gleicher Vergrößerung ein Schaden von 8,5%, bei 5%igem Albumin von 4% zu dokumentieren. Venen aus der Kontrollgruppe (nicht inkubierte, unmittelbar fixierte Proben) wiesen bei 1000-facher Vergrößerung einen Endothelverlust von 4% auf (Grafik1).

Bei 1800-facher Vergrößerung fanden sich auf den Venenpräparaten nach NaCl- Lagerung 56% freiliegendes Subendothel. Bei Venen in Zellkulturmedium mit 20%igem Albumin war die Oberfläche zu 30% deendothelialisiert, bei 5%igem Albumin zu 21,3%. In der Kontrollgruppe war mit wiederum 4% der niedrigste Endothelzellverlust festzustellen. Die Auswahl der ausgewerteten Areale erfolgte in der 1800-fachen Vergrößerung unter dem Aspekt einer hohen lokalen Zellschädigung und erklärt die höheren prozentualen Endothelzellschäden gegenüber der geringeren Vergrößerung.

Grafik 1:



3.1.2 Semiquantitative Auswertung des Endothelzellschadens

500-fache Vergrößerung

Die semiquantitative Auswertung in Anlehnung an Gundry et al. und Bush et al. zeigte bei 500-facher Vergrößerung in der Kontrollgruppe die geringste Schädigungsrate (2 Punkte). Die in Zellkulturmedium mit 5%igem bzw. 20%igem Albumin gelagerten Venenpräparate unterschieden sich mit 5 bzw. 7 Punkten nicht signifikant. Die höchste Rate an Endothelzellschaden fand sich bei den Venenpräparaten nach Kochsalzlagerung (12 Punkten).

Tabelle 1:

Parameter	Kontrolle	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Endothelzellverlust	0	0	1	3
Verlust der endothelialen Zellverbindungen	1	2	2	4
freiliegende Basalmembran und Kollagengewebe	0	1	2	3
Auflagerungen	1	2	2	2
Summe	2	5	7	12

Bewertung des Endothelzellschadens in Anlehnung an Gundry und Bush (4, 21) bei 500-facher Vergrößerung

Kontrolle: Venenmaterial ohne Inkubation
 Gruppe 1: Medium 199 + 5% Albumin
 Gruppe 2: Medium 199 + 20% Albumin
 Gruppe 3: 0,9%iges NaCl

Schweregrad des Endothelzellschadens:

0 = kein Schaden	3= 25 - 50%	6= >90%
1 = < 10%	4= 50 - 75%	
2 = 10 - 25%	5= 75 - 90%	

1000-fache Vergrößerung

Unter 1000-facher Vergrößerung lag der Schädigungsgrad der Präparate in Zellkulturmedium mit 5%igem Albumin bei 1 Punkt, der der Präparate in Zellkulturmedium mit 20%igem Albumin bei 5 Punkten. Die schwerste Beschädigung fand sich bei Venensegmenten der physiologischen Kochsalz - Gruppe (9 Punkten). Für diese Vergrößerung fehlt eine Kontrollgruppe.

Tabelle 2:

Parameter	Kontrolle	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Endothelzellverlust	-	0	1	2
Verlust der endothelialen Zellverbindungen	-	0	2	1
freiliegende Basalmembran und Kollagengewebe	-	0	1	2
Auflagerungen	-	1	1	2
Summe	-	1	5	9

Bewertung des Endothelzellschadens in Anlehnung an Gundry und Bush (4, 21) bei 1000-facher Vergrößerung

Legende

- Kontrolle: Venenmaterial ohne Inkubation
- Gruppe 1: Medium 199 + 5% Albumin
- Gruppe 2: Medium 199 + 20% Albumin
- Gruppe 3: 0,9%iges NaCl

Schweregrad des Endothelzellschadens:

- | | | |
|------------------|-------------|---------|
| 0 = kein Schaden | 3= 25 - 50% | 6= >90% |
| 1 = < 10% | 4= 50 - 75% | |
| 2 = 10 - 25% | 5= 75 - 90% | |

3000-fache Vergrößerung

Unter Berücksichtigung aller Vergrößerungen traten nach Inkubation in M199 mit 5%igem bzw. 20%igem Albumin keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ($2,3 \pm 2,3$ vs. $1,5 \pm 0,7$ $p=0,66$ bzw. $5,0 \pm 2,0$ vs. $1,5 \pm 0,7$ $p=0,10$) (T-Test für unabhängige Proben) auf. Die schwersten Zellschäden fanden sich in der Gruppe der in physiologischer Kochsalzlösung gelagerten Venen, diese unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($9,6 \pm 2,1$ vs. $1,5 \pm 0,7$ $p=0,014$).

Tabelle 3:

Parameter	Kontrolle	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Endothelzellverlust	0	0	0	3
Verlust der endothelialen Zellverbindungen	0	0	1	1
freiliegende Basalmembran und Kollagengewebe	0	0	0	3
Auflagerungen	1	1	2	1
Summe	1	1	3	8

Bewertung des Endothelzellschadens in Anlehnung an Gundry und Bush (4,21) bei 3000-facher Vergrößerung

Legende

- Kontrolle: Venenmaterial ohne Inkubation
- Gruppe 1: Medium 199 + 5% Albumin
- Gruppe 2: Medium 199 + 20% Albumin
- Gruppe 3: 0,9%iges NaCl

Schweregrad des Endothelzellschadens:

- | | | |
|------------------|-------------|---------|
| 0 = kein Schaden | 3= 25 - 50% | δ= >90% |
| 1 = < 10% | 4= 50 - 75% | |
| 2 = 10 - 25% | 5= 75 - 90% | |

3.1.3 Morphologische Beurteilung

Bei allen Gewebeproben traten Schrumpfung, bedingt durch Fixierung und Dehydrierung, auf. Da diese Artefakte in allen Gruppen gleichermaßen zum Vorschein kamen und nicht nur das Endothel, sondern die Präparate in ihrer Gesamtheit betrafen, wurde die Beurteilbarkeit der endothelialen Oberfläche und Morphologie nicht wesentlich beeinträchtigt.

Kontrollgruppe

Das Endothel der Venengrafts (s. Abb. 1,2,3) aus der Kontrollgruppe stellt sich als regelmäßige Zelloberfläche dar. Die Endothelzellen, die sich entlang der Längsachse des Gefäßes ausgerichtet haben, bilden ein polygonales Muster mit sich vorwölbenden Zellkernen, dem sog. Pflastersteinrelief. Es ist nur eine geringfügige Separation der endothelialen Interzellularverbindungen sichtbar, ein Verlust von Endothelzellen tritt vereinzelt auf. Auf allen Venengrafts werden Ausstülpungen der Endothelzellen beobachtet, die als mikrovilliförmige und granuläre Oberflächendifferenzierungen interpretiert werden (18). An wenigen Stellen wird eine Adhärenz von Blutbestandteilen, wie Leukozyten und Thrombozyten, an die Endotheloberfläche verzeichnet. Insgesamt spiegelt die Oberfläche der nativ konservierten Venensegmente ein morphologisch nahezu intaktes Endothel wider.

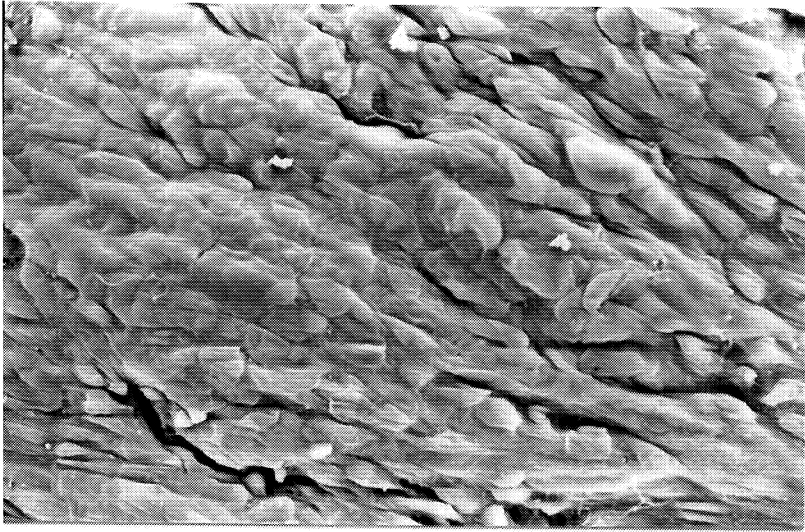


Abb. 1 500-fache Vergrößerung

Das intakte Endothel der Kontrollvenen weist die für Endothelzellen typische rundliche Kernanschwellung in der Zellmitte auf. Die Zellen sind in Richtung des Blutflusses ausgerichtet.

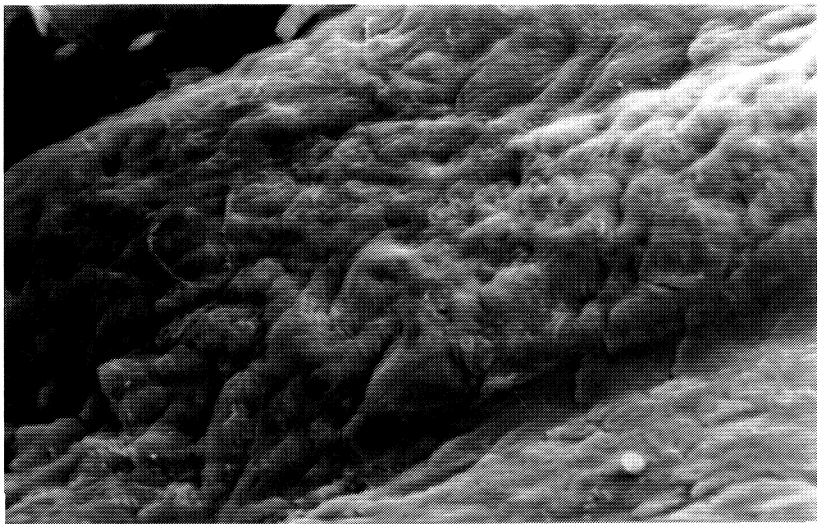


Abb. 2 500-fache Vergrößerung

Das Endothel des Venengrafts zeigt nach sofortiger Fixierung das charakteristische polygonale Pflasterrelief.

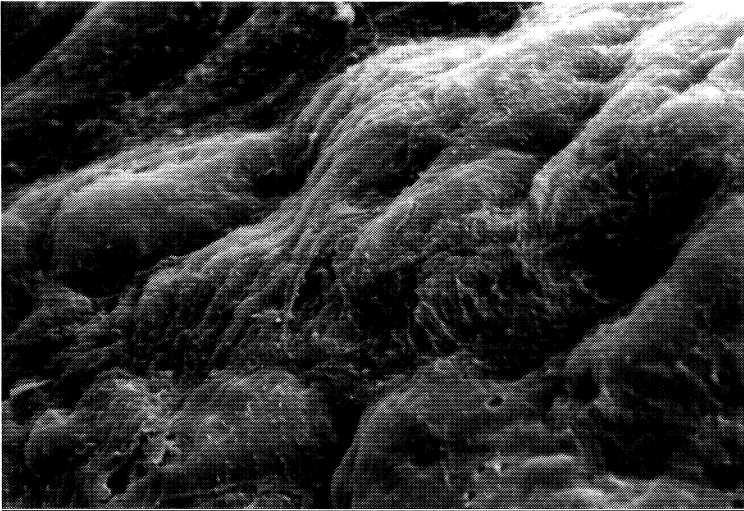


Abb. 3 2000-fache Vergrößerung

Bei einer höheren Auflösung sind auf den Endothelzellen der Kontrollgruppe kleine mikrovilliförmige und granuläre Oberflächendifferenzierungen sichtbar, die sich über die gesamte Zellfläche verteilen.

M199 + 5% Albumin

Nach Lagerung in Zellkulturmedium mit 5%igem Albumin erscheinen die Endothelzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur geringfügig alteriert, offenbar wird das Endothel in diesem Medium gut konserviert. Die lumenale Oberfläche der Venengrafts wird von einer durchgehenden Schicht von Endothelzellen bedeckt, wobei nur an wenigen Stellen Endothelzellseparationen erkennbar sind. Der Hauptteil der Endothelzellen bildet intakte Interzellularkontakte. Oberflächendifferenzierungen ähnlich denen der Kontrollgruppe sind beobachtbar.

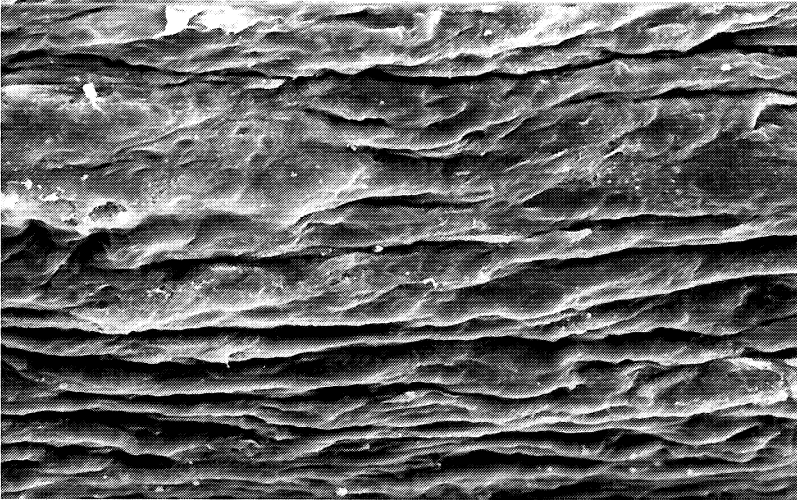


Abb. 4 500-fache Vergrößerung

Bei Lagerung in Zellkulturmedium mit 5%igem Albuminanteil werden die Endothelzellen gut konserviert. Sie sind in Flussrichtung angeordnet und weisen überwiegend intakte Zellgrenzen auf. An einigen Stellen sind milde Zellseparationen zu erkennen.

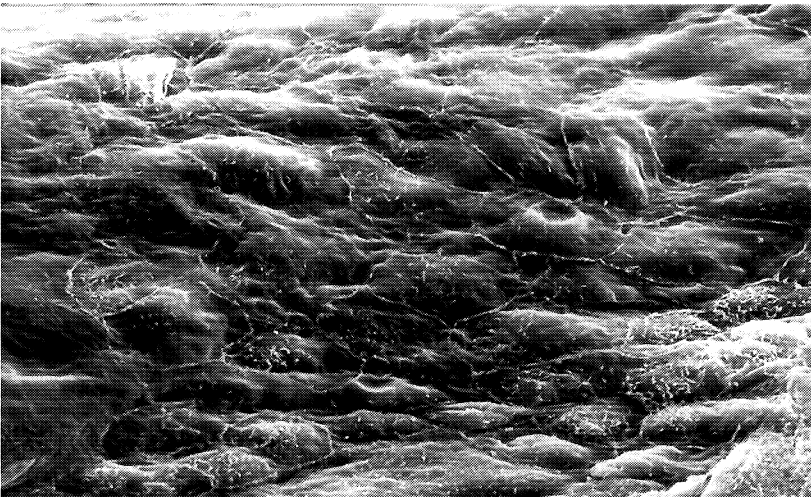


Abb. 5 1000-fache Vergrößerung

Die endotheliale Zelloberfläche der Venengrafts nach Inkubation mit Zellkulturmedium mit 5%igem Albumin zeigt eine gute Konservierung der Endothelzellen mit intakten Interzellularkontakten. Die Zellen bilden ein polygonales Muster mit sich vorbuckelnden Zellkernen und mikrovillartigen Ausstülpungen auf der Oberfläche.

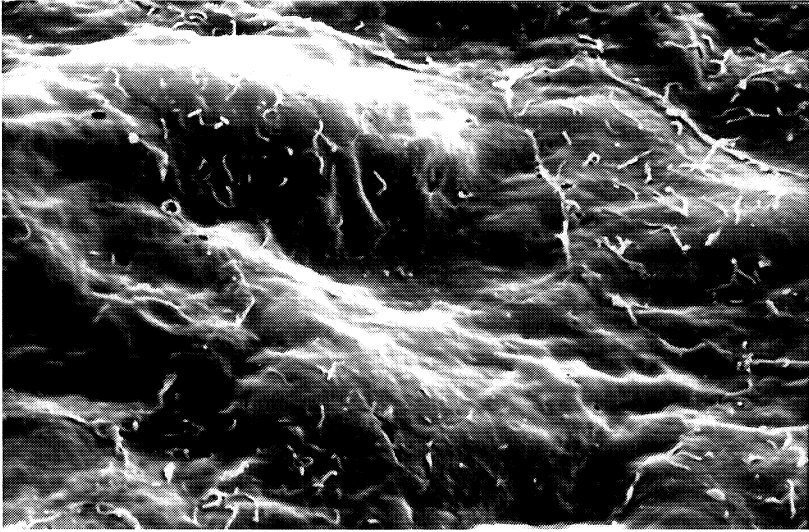


Abb. 6 3000-fache Vergrößerung
Wie Abb. 5 in höherer Vergrößerung.

M199 + 20% Albumin

Präparate dieser Gruppe weisen ein auffällig unruhiges, raues Oberflächenrelief mit vermehrten Auflagerungen auf. Gehäuft werden Dissoziationen der Endothelzellen beobachtet, allerdings nur selten ein kompletter Endothelverlust.



Abb. 7 500-fache Vergrößerung

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist nach Lagerung in Zellkulturmedium mit 20%igem Albuminanteil die Zellform variabler. In manchen Arealen ist eine Dissoziation der Endothelzellen aus dem Zellverband zu erkennen.

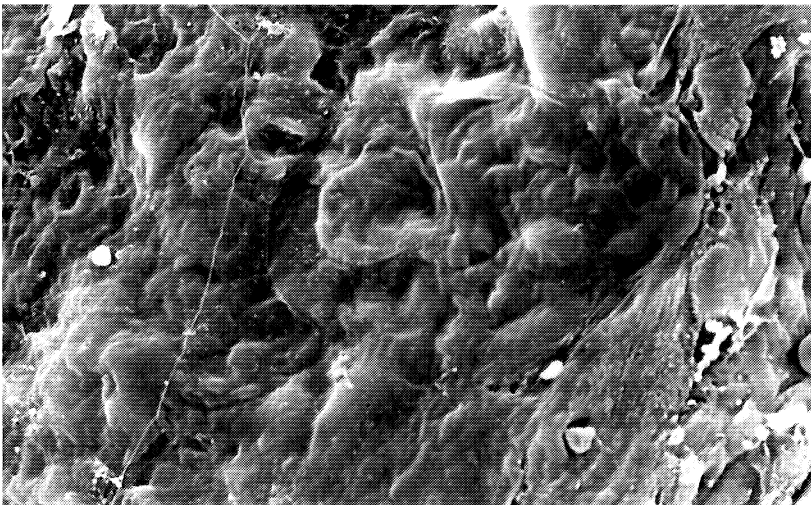


Abb. 8 1000-fache Vergrößerung

Bei Venengrafts nach Inkubation mit Zellkulturmedium mit 20%igem Albuminanteil ist die Zelloberfläche rauer, mit deutlich vermehrten Auflagerungen.

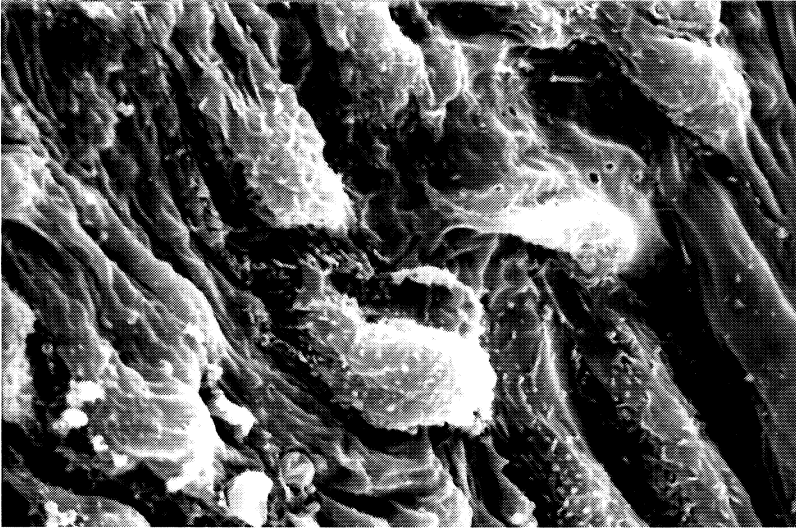


Abb. 9 3000-fache Vergrößerung

Die Endothelzellen zeigen eine raue Zelloberfläche, mit Protrusionen und Auflagerungen. Stellenweise ist der Endothelzellverband aufgelockert.

0,9%iges NaCl

Die Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung bedingt die höchste Rate an Beschädigung der Endothelmorphologie, große Endothelzellverluste mit Dissoziation der noch vorhandenen Zellen werden sichtbar. In komplett deendothelialisierten Arealen ist freiliegende Basalmembran und Kollagengewebe zu erkennen. Daher konserviert physiologische Kochsalzlösung die Endothelschicht offenbar am unbefriedigsten.

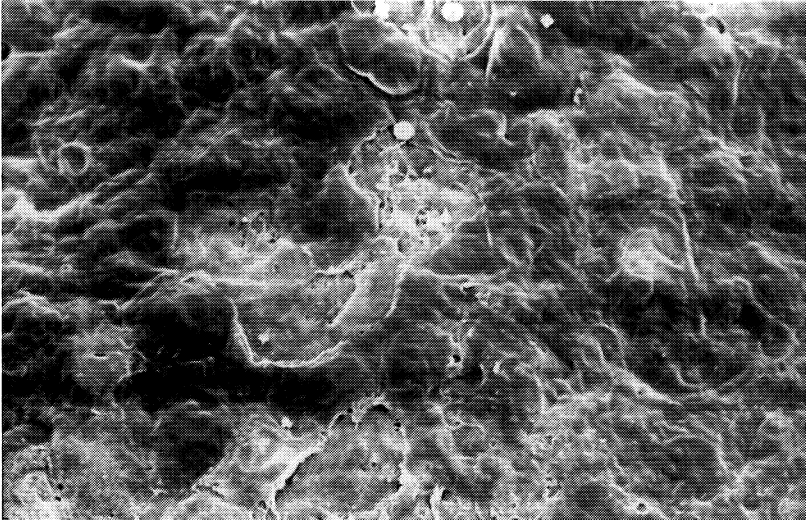


Abb. 10 500-fache Vergrößerung
Nach Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung zeigen sich große Areale mit Endothelzellverlust mit sichtbarer freiliegender Basalmembran und Kollagenfibrillen.

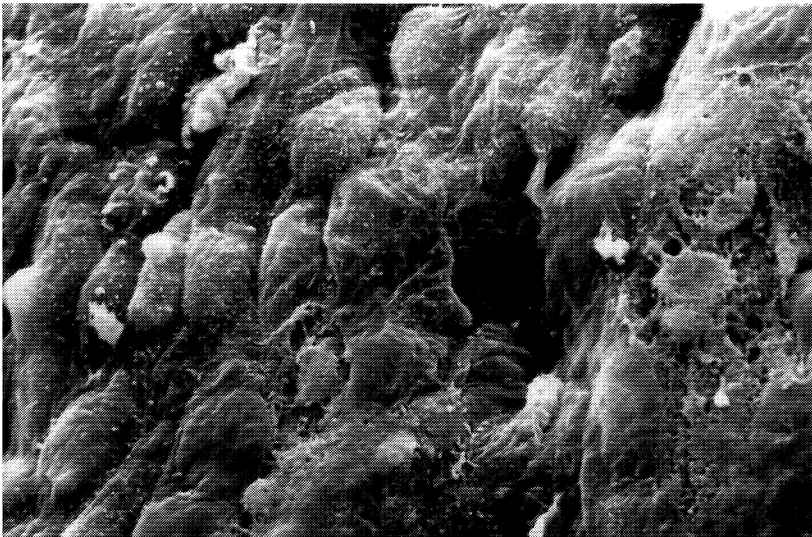


Abb. 11 1000-fache Vergrößerung
Es sind Areale mit Endothelzelldissoziation und adhärennten Blutzellen sichtbar.

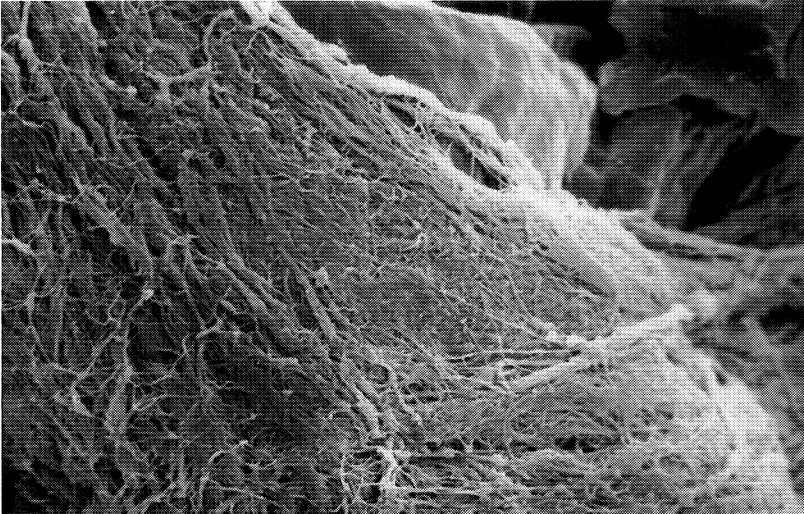


Abb. 12 1800-fache Vergrößerung

Nach Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung zeigt die Endotheloberfläche einen totalen Zellverlust und es stellt sich freiliegendes Kollagengewebe dar.

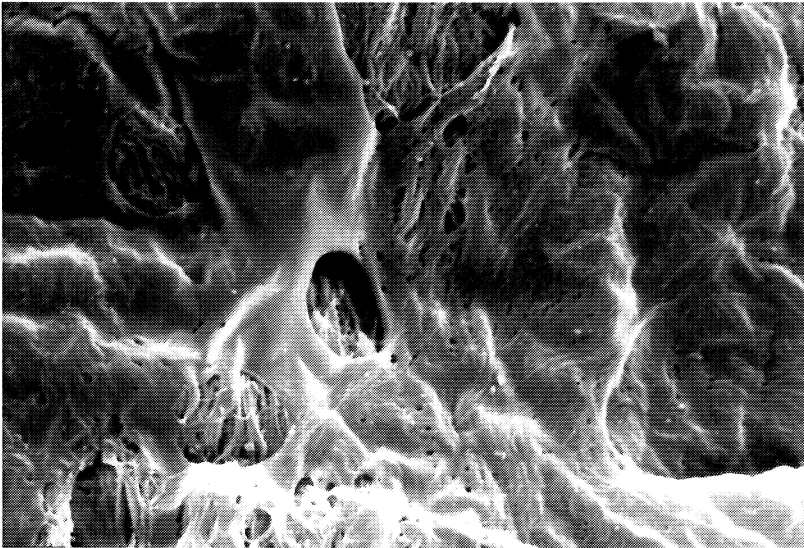


Abb. 13 3000-fache Vergrößerung

Die Lagerung in physiologischem NaCl bewirkt eine schwere Beschädigung der Endothelzellen mit Exposition der subendothelialen Schichten.

3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die venösen Endothelzellen nach 45-minütiger Lagerung in Zellkulturmedium mit 5%igem wie auch 20%igem Albuminanteil gut erhalten waren und kaum Unterschiede zu der Kontrollgruppe (Abb. 14a) aufwiesen, die sofort nach Entnahme fixiert wurden. Wenn physiologische Kochsalzlösung als Lagerungsmedium verwendet wurde, waren die Endothelzellen nur spärlich nachweisbar (Abb. 14, b-d). Die verbliebenen Endothelzellen waren hydropisch geschwollen (b, Pfeil) und Zeichen der Zellauflösung wurden sichtbar (c, Pfeilspitze, Pfeile: Zytoplasma einer Endothelzelle). Die Endothelzellen sind von der bloßliegenden Basalmembran komplett abgelöst (b, Pfeilspitze, d, Pfeilspitze). Insgesamt konnte die kursorische Untersuchung der Präparate mit der Transmissionselektronenmikroskopie die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie bestätigen und erweitern. Selbst da, wo noch Endothelzellen vorhanden sind, führt die Lagerung in Kochsalz zu schweren Schädigungen im Zytoplasma und insbesondere den Zellorganellen mit Quellung und oft sogar kompletter Zerreißung der Organellenmembran.

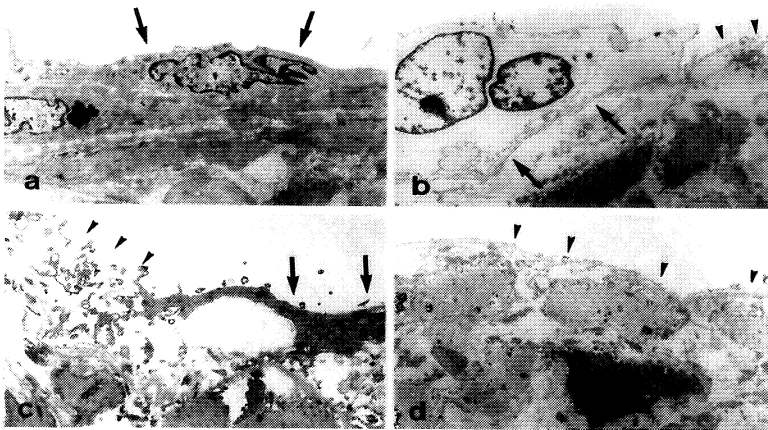


Abb. 14 Transmissionselektronenmikroskopie

3.3 Immunhistochemie

Nach immunhistologischer Färbung der Endothelzellen mit CD 34 ist eine kontinuierliche Endothelzellschicht sichtbar (nach Inkubation mit Zellkulturmedium mit 5%igem Albumin) (Abb. 15 a, Pfeilspitzen). Im Kontrast dazu finden sich nach Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung nur noch wenige Endothelzellen (Abb. 15 b, Pfeile), die auf der Basallamina gelegen sind.

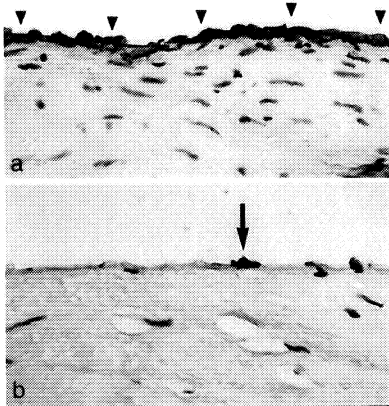


Abb. 15 Immunhistochemie

4. Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede der morphologischen Integrität der Endothelzellschicht in Abhängigkeit des gewählten Lagerungsmediums unter Bedingungen die Standardverfahren der arteriovenösen koronaren Bypassanlage entsprechen. In physiologischer Kochsalzlösung findet sich bereits nach 45 Minuten eine 56,5 % Ablösung der Endothelzellschicht mit entsprechend freiliegendem Subendothel. Darüber hinaus zeigten in dieser Lösung auch gefäßständige Endothelzellen transelektronenmikroskopische Zeichen einer irreversiblen Zellschädigung (Zellhydrops/Karyolyse). Dies dürfte in vielen Fällen einem irreversiblen Zellschaden entsprechen, dessen Ausmaß in den rasterelektronischen Bildern unterschätzt wird, da bis zum Eintritt der Zellnekrose mehrere Stunden vergehen. In albuminhaltigen Lagerungsmedien war eine deutlich geringere Störung der Intimaintegrität sowohl in der REM als auch in der TEM Untersuchung feststellbar. Die wenigen vorliegenden Daten anderer Arbeitsgruppen bestätigen die erwarteten funktionellen Konsequenzen einer endothelialen Dysfunktion bei derart gestörter Intimastruktur. Zerkowski et. al. (43) beschrieben bereits 1993 eine erhebliche Beeinträchtigung der acetylcholininduzierten und daher endothelvermittelten Gefäßrelaxation in Abhängigkeit des gewählten Lagerungsmediums. Nach 60 minütiger Lagerung humaner Venensegmente in heparinisiertem Vollblut konnte gegenüber frisch entnommenen Kontrollen eine zu 72,4% erhaltenen Gefäßantwort auf Acetylcholin dokumentiert werden. Die

Verwendung von Bretschneiders kardioplegischer Lösung (44%) aber insbesondere von humaner Albuminlösung (0%) oder Ringer-Lösung (0%) führte zu deutlich beeinträchtigter, respektive zum Verlust der Gefäßrelaxation auf Acetylcholinreiz. Auch wenn keine strenge Vorhersagbarkeit funktioneller Beeinträchtigungen nach Kriterien des morphologischen Endothelschadens gezeigt werden konnte, wurde ein klarer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der morphologischen Schädigung in Abhängigkeit des gewählten Mediums einerseits und der Beeinträchtigung endothelabhängiger Gefäßregulation andererseits deutlich(43).

Die beobachtete ausgeprägte Schädigung unter humaner Albuminlösung konnte von uns nicht bestätigt werden. Inwieweit sich verfahrenstechnische Ursachen z.B. Schaumbildung im Organbad hierfür verantwortlich zeichnen, muss offen bleiben.

Unsere Beobachtung nachteiliger Wirkungen reiner Elektrolytlösungen wie physiologischer Kochsalzlösung, Ringer-Laktatlösung oder Euro-Collinslösung hinsichtlich der Intimaintegrität wird von den Ergebnissen einer Vielzahl anderer Arbeitsgruppen (4, 6, 12 ,25) gestützt. Bei reinen Elektrolytlösungen ist von mehreren Schädigungsmechanismen auszugehen. Neben dem Fehlen notwendiger Stoffwechselsubstrate (insbesondere Glucose), führen Elektrolytlösungen zu einem onkotischen Gradienten und in der Folge zu einer strukturellen Belastung des Venengrafts, insbesondere aber physiologische Kochsalzlösungen wegen

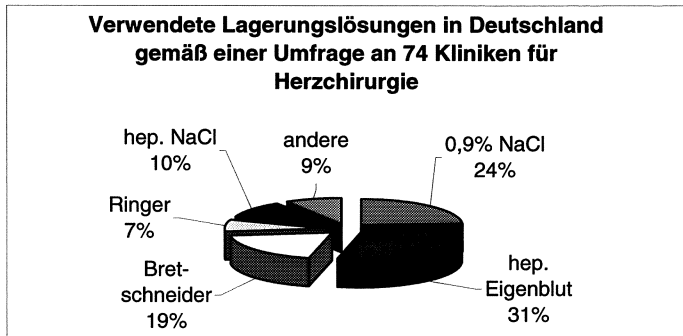
ihres massiven Eingriffs in die Kalium- bzw. Kalziumhomöostase zu einer erheblich Belastung der funktionellen und in der Folge strukturellen Integrität der Endothelzellschicht. Albumingestützte Zellkulturmedien zeigten in unseren Versuchen das erwartete geringere Schädigungspotential zumindest auf zellulär, struktureller Ebene.

Trotz klinischer Hinweise (5) besteht bisher keine Studienlage, die die Wahl eines bestimmten Lagerungsmediums im Hinblick auf die Offenheitsrate des Venenbypasses beim Menschen bevorzugt. Tierexperimentelle Daten weisen allerdings auf eine erhebliche Bedeutung der intraoperativen Endothelzellschädigung hinsichtlich mittel- und langfristiger Schädigung der Gefäßarchitektur hin. So beobachtete Quist 1992 (33) anhand von Reimplantationversuchen nach gezielter Schädigung von Hundevenen mit physiologischer Kochsalzlösung innerhalb von 24h die erwartete Thrombozytenaggregation und Leukozyteninvasion in Gebieten freiliegenden Subendothels. Obwohl nach weiteren sieben Tagen eine intakte Endothelauskleidung durch Proliferation benachbarter Endothelzellen sichtbar wurde, zeigten die initial betroffenen Gefäßabschnitte mittelfristig eine gegenüber nicht geschädigten Abschnitten erhöhte Intimadicke, als möglichen Prädiktor lokal akzelerierter Arteriosklerose. Die quasi 1:1 Übertragung dieser tierexperimentellen Daten auf die Situation beim Menschen ist sicher fragwürdig. Allerdings lässt das bisher ungelöste Problem früher und mittelfristiger Graftverschlüsse die Optimierung der Lagerungslösung, ähnlich der in letzter Zeit auch durch Studien abgesicherten Optimierung der schonenden Venenentnahmetechnik (37), als sinnvoll erscheinen.

Bei einer 12-20% Verschlussrate (44) schon im ersten Jahr postoperativ und bei einer Offenheitswahrscheinlichkeit von nur 50% nach 10 Jahren mit entsprechend hohen Reoperationsraten (7,1% aller 71215 kardialen Bypassoperationen pro Jahr in Deutschland)(14,35) kommt der Prävention akzelerierter Arteriosklerose im Graft eine erhebliche gesundheitsökonomische Bedeutung zu. In den letzten Jahrzehnten konnten entscheidende Schritte in der Entwicklung hin zur Arteriosklerose, insbesondere die subendotheliale Ablagerung oxidiertes oder glykosilierter LDL-Partikel mit subsequenter Schaumzelltransformation eingedrungener Leukozyten und Perpetuierung entzündlicher Prozesse, sowie die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion insbesondere hinsichtlich verringerter Stickstoffmonoxidregeneration mit verstärkter Mediamyozytenproliferation und Störung der Blutflussregulation aufgedeckt werden. In sämtlichen dahingehend entscheidenden Prozessen kommt der morphologischen und insbesondere funktionellen Integrität des Endothels eine herausragende Bedeutung zu. Vor dem Hintergrund der offenbar am venösen Gefäß unter arteriellen Anforderungen und Bedingungen ohnehin beschleunigten Arteriosklerose überrascht der Umstand der bisher offenbar wenig standardisierten bzw. optimierten Lagerungslösung, wie anhand einer bisher nicht veröffentlichten, nicht repräsentativen Umfrage (siehe Grafik 2) beispielhaft sichtbar wird. Unsere Ergebnisse stützen die Forderung nach einer prospektiven Studie hinsichtlich des optimalen Lagerungslösung, ähnlich bereits vorliegender Studien zur

gefäßschonenden operativen Vorgehensweise zur Gewinnung des venösen Grafts, als aus unserer Sicht wichtigen Teilaspekt zur Verminderung der Bypassverschlussraten.

Grafik 2



5. Schlussfolgerung

Unsere Studie hebt nochmals die Bedeutung der Lagerungslösung im Hinblick auf die endotheliale Integrität heraus. Die bisher häufig praktizierte Lagerung der Venengrafts während einer aortocoronaren Bypassoperation in physiologischer Kochsalzlösung sollte aufgrund der in unserer Arbeit aufgezeigten Zerstörung der Endothelschicht verlassen werden. Für die beste Konservierung der endothelialen Schicht ist eine Modifizierung der herkömmlichen Lagerungsmedien dringend notwendig. Eine Möglichkeit stellt ein albuminhaltiges Zellkulturmedium dar. Eine Bestätigung unserer Ergebnisse im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie erscheint notwendig und erfolgversprechend.

6. Zusammenfassung

Die Langzeitresultate von aortocoronaren Venenbypässen unter Verwendung von Vena saphena magna Interponaten hängen neben vielen anderen Faktoren maßgeblich von der Integrität des Gefäßendothels ab. Ein intaktes Endothel spielt für die Offenheit des Grafts eine entscheidende Rolle, da Endothelverletzungen die Entwicklung vorzeitiger thrombotischer Graftverschlüsse triggern und auch an den späten Graftverschlüssen durch Intimahyperplasie und Einsprossung glatter Muskelzellen beteiligt sind. So spielt die Vermeidung intraoperativer Endothelschädigungen der Venengrafts durch die Lagerungsmedien eine entscheidende Rolle.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, das Endothel von Venengrafts nach Inkubation mit verschiedenen Lagerungslösungen mit direkten Nachweismethoden wie Rasterelektronen- und Transelektronenmikroskopie zu untersuchen.

Untersucht wurden sieben cm lange Venensegmente von sechs Patienten, die sich einer ACVB-Operation unterzogen. Die Präparation der Venen fand unter standardisierten Bedingungen statt. Anschließend erfolgte die Inkubation jeweils eines Drittels der entnommenen Segmente für 45 Minuten in einer der folgenden Lagerungsmedien, physiologische Kochsalzlösung, Medium 199 + 20mM HEPES + 5% bovines Serumalbumin und Medium 199 + 20mM HEPES + 20% humanes Serumalbumin. Die Auswertung des Endothelzellschadens erfolgte mittels raster- und transelektronenmikroskopischer Untersuchungen sowie histopathologischer Aufarbeitung.

Venensegmente nach Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung zeigen signifikante Schädigungen der Endothelzelloberfläche. Bereits nach 45-minütiger Lagerung findet sich in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine 56,5%ige Ablösung der Endothelzellschicht, transelektronenmikroskopisch kann man Zellschädigungen im Sinne von Zellhydrops und Karyolyse nachweisen. Dagegen findet man nach Lagerung in Medium 199 mit 20%igem Albuminanteil bei Betrachtung mit dem Rasterelektronenmikroskop deutlich geringere Zellschädigungen. Das Endothel von Venen nach Inkubation mit Nährmedium mit 5%igem Albuminanteil stellt sich nahezu intakt, ohne wesentliche Zerstörungen der Zelloberfläche dar.

Unsere Arbeit konnte belegen, dass die Lagerungsmethode einen deutlichen Einfluss auf das Gefäßendothel ausübt. Um möglichst große Anteile intakten Endothels zu gewährleisten, bedarf es einer Modifizierung der bisherigen Handhabung der Venenlagerung während einer aortocoronaren Venenbypass-Operation. Eine Möglichkeit dazu könnte in der Lagerung in Zellkulturmedium mit einem 5%igen Albuminanteil gesehen werden.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Beghi C, Nicolini F, Budillon AM, Borrello B, Ballore L, Reverberi C, Gherli T Midterm clinical results in myocardial revascularization using the radial artery. *Chest* 2002; 122(6):2075-9.
- 2 Boerboom L, Wooldridge T, Olinger G, Rusch N Effects of storage solutions on contraction and relaxation of isolated saphenous veins. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1992; 20 (suppl 12): 80-84.
- 3 Bryan A, Angelini G The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention. *Current Opinion in Cardiology* 1994; 9: 641-649.
- 4 Bush H, Jakubowski J, Curl R, Deykin D, Nabseth D The natural history of endothelial structure and function in arterialized vein grafts. *Journal of Vascular Surgery* 1986; 3: 204-215.
- 5 Catinella FP, Cunningham JN Jr, Srungaram RK, Baumann FG, Nathan IM, Glassman EA, Knopp EA, Spencer FC The factors influencing early patency of coronary artery bypass vein grafts: correlation of angiographic and ultrastructurell findings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 83 (5):686-700.
- 6 Cavallari N, Abebe W, Mingoli A, Sapienza P, Hunter W, Agrawal D, Cavallaro A, Edwards J Short-term preservation of autogenous vein grafts: effectiveness of University of Wisconsin solution. *Surgery* 1987;121: 64-71.
- 7 Chester A, O'Neil G, Tadjakarimi S, Borland J, Yacoub M

Effect of perioperative storage solution on the vascular reactivity of the human saphenous vein. *J Cardio-thoracic Surg* 1999; 7: 399-404.

8 Christenson J, Schmuziger M Sequential venous bypass grafts: results 10 years later. *Ann Thorac Surg* 1997; 63 (2): 371-376.

9 Cox J, Chiasson D, Gottlieb A 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 Cardiovascular Diseases* 1991; 34: 45-68.

10 Cross S, El-Sanadiki M, Murray J, Mikat E, McCann R, Hagen P Functional abnormalities of experimental autogenous vein graft neoendothelium. *Ann Surg* 1988; 11: 631-638.

11 Davies M, Hagen P The vascular endothelium. A new horizon. *Annals of Surgery* 1993; 218: 593-609.

12 Davies M, Hagen P Influence of perioperative storage solutions on long-term vein graft function and morphology. *Annals of Vascular Surgery* 1994; Vol. 8, No. 2: 150-157.

13 Drenckhahn D und Zenker W (Hrsg) Benninghoff: Anatomie. Band I. Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1994.

14 Emmrich K Aortokoronare Bypass-Operationen - Determinanten für ihre Langzeitresultate. *Internist* 1998; 7: 749-753.

15 Favaloro R Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *The Annals of Thoracic Surgery* 1968; 5: 334-339.

- 16** Favalaro R The present era of myocardial revascularisation – some historical landmarks. *International Journal of Cardiology* 1983; 4: 331-344.
- 17** Flegler S, Heckman J, Klomprens K
Elektronenmikroskopie: Grundlagen - Methoden - Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1995.
- 18** Fujita T, Tanaka K, Tokunaga J Kreislauf und blutbildendes Gewebe aus Zellen und Gewebe - ein REM-Atlas für Mediziner und Biologen. Fischer, Stuttgart, New York 1986.
- 19** Goldhaber S, Hirsch D, MacDougall R, Polak J, Creager M, Cohn L Prevention of venous thrombosis after coronary artery bypass surgery (a randomized trial comparing two mechanical prophylaxis strategies). *Am J Cardiol* 1995; 76: 993-996.
- 20** Guerra R, Brotherton AFA, Goodwin PJ et al. (1989) Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels* 1989; 26: 300-314.
- 21** Gundry S, Jones M, Ishihara T, Ferrans V (1980) Optimal preparation techniques for human saphenous vein grafts. *Surgery* 1980; 88 785- 794.
- 22** Gundry S, Jones M, Ishihara T, Ferrans V Intraoperative trauma to human saphenous veins: scanning electron microscopic comparison of preparation techniques. *Annals of thoracic Surgery* 1980; 30: 40-47.
- 23** Haller H Endothelial functions. General considerations. *Drugs* 1997; 53, Suppl. 1: 1-10.

- 24** Hata MM, Seevanayagam SS, Manson NN, Rosalion AA, Matalanis G, Raman JJ, Buxton BF Radial artery 2000 risk analysis of mortality for coronary bypass surgery with radial artery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 8(6):354-7.
- 25** Haudenschild C, Gould K, Quist W, LoGerfo F Protection of endothelium in vessel segments excised for grafting. *Circulation* 1981; 64, Suppl 2: 101-107.
- 26** Hirose H, Amano A, Takanashi S, Takanashi A Coronary artery bypass grafting using the gastroepiploic artery in 1000 patients. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(5):1371-9.
- 27** Kalmár P Leistungen der Deutschen Herzchirurgie 1997. Pressemitteilung anlässlich der 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Dresden 18.-21.2.1998.
- 28** Kelm M, Strauer B Endotheliale Dysfunktion. Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist* 1999; 12: 1300-1307.
- 29** Kirklin JW, Barratt-Boyes Cardiac surgery 1993; 2nd ed. Churchill-Livingstone Inc, 1: 313-333.
- 30** Kockx M et al. Luminal foam cell accumulation is associated with smooth muscle cell death in the intimal thickening of human saphenous vein grafts. *Circulation* 1996; Vol.64, No. 6: 1255-1262.
- 31** Lannerstad O, Dougan P, Bergquist D Effects of different graft preparation techniques on the acute thrombogenicity of autologous vein grafts. *Eur Surg Res* 1987; 19: 395-399.
- 32** Lorenzi M, Cagliero E Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40: 653-659.

- 33** Quist W, LoGerfo F Prevention of smooth muscle cell phenotypic modulation in vein grafts: a histomorphometric study. *J Vasc Surg* 1992; 16: 225-231.
- 34** Santos GG, Stolf NA, Moreira LF, Haddad VL, Simoes RM, Carvalho SR, Salgado AA, Avelar SF Randomized comparative study of radial artery and right gastroepiploic artery in composite arterial graft for CABG. *Eur J Cardiorac Surg* 2002; 21(6):1009-14.
- 35** Deutsche Jahresstatistik. *Thorac cardiovasc Surgeon* 2002;50: 30-35
- 36** Steer M Zellstrukturen. Stereologie und andere cytometrische Methoden. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, 1984
- 37** Svendsen E, Dalen H, Moland J, Engedal H A quantitative study of endothelial cell injury in aorto-coronary vein grafts. *J Caridovasc Surg* 1986; 27: 65-71.
- 38** Wagner R Intimal protection of bypass-veins during intraoperative storage in blood or Euro-Collins-Solution: The role of medium, temperature and time. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1990; 38: 151-156.
- 39** Wagner R, Skupin M, Zegelman M, Satter P Protektion der Tunica intima während der Aufbewahrung von Venenbypasses von der Entnahme bis zur Implantation. *Helv chir Acta* 1991; 58: 509-513.
- 40** Weibel E Practical methods for biological morphometry. *Stereological methods*. Vol. 1 Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco 1979.
- 41** Welz A, Stadtmüller A, Schäffer U, Strohschneider T, Hannekum A Cytotoxicity of various crystalloid solutions to

the endothelial cells of autologous grafts. Thorac

Cardiovasc Surgeon 1991; 39 (suppl): 236-240.

42 Willmann L Aortocoronary Bypass with saphenous vein graft. JAMA 1996; 276: 1521-1525.

43 Zerkowski H, Knocks M, Konerding M, Doetsch N, Roth G, Hakim K, Reidemeister J Endothelial damage of the venous graft in the CABG. Influence of the solutions used for storage and rinsing on the endothelial function. Eur J Cardio-thorac Surg 1993; 7: 376-382.

44 Zhu Z, Li H, Zhang B Expression of endothelin-1 and constitutional nitric oxide synthase messenger RNA in saphenous vein endothelial cells exposed to arterial flow shear stress. Ann Thorac Surg 1997; 64: 1333-1338.

45 Zilla P, Oppell Uv, Deutsch M The endothelium: a key to the future. J Cardiac Surg 1993; 8: 32-60.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Elerl

danke ich für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. med. Müller

danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. med. Dämmrich

danke ich für die Ratschläge zum Versuchsaufbau und für die Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate.

Herrn Dr. med. Hickethier

danke ich herzlich für die Organisation des Versuchsablaufes sowie für seine kollegiale Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen und der Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Dr. med. Schnittler

danke ich für die Überlassung der Nährmedien.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei den MitarbeiterInnen des pathologischen und biochemischen Institutes der Universität Würzburg für die Unterstützung bei der Bearbeitung der histologischen Präparate bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Saskia Finster
Geburtsdatum	01.10.1973
Geburtsort	Schweinfurt
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Schulausbildung

1980 - 1984	Kerschensteiner Grundschule Schweinfurt
1984 - 1993	Celtis-Gymnasium Schweinfurt, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1993 - 1995	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
1995 - 1998	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
1998 - 1999	Praktisches Jahr

Examina

September 1995	Physikum
August 1996	Erstes Staatsexamen
September 1998	Zweites Staatsexamen
November 1999	Drittes Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

01.03.2000 – 31.12.2001 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum bzw.

Assistenzärztin in der Frauenklinik des
Kantonsspitals Luzern/ Schweiz

seit 01.01.2002

Assistenzärztin in der Frauenklinik Amberg

Saskia Frust

Amberg, den 10.01.2005

