

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Histomorphologische Evaluation arterieller Allografts nach
Kryokonservierung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Monique Pöttsch

aus Herzberg/Elster

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Deutsches Abstrakt	Seite 4
Englisches Abstrakt	Seite 5
1. Einleitung	Seite 6
1.1. Geschichtliches	Seite 6
1.2. Indikationen zur Verwendung arterieller Homografts	Seite 8
1.3. Konservierung und Lagerung von arteriellen Homografts	Seite 9
1.4. Fragestellung	Seite 11
2. Methoden	Seite 13
2.1. Studiendesign	Seite 13
2.2. Patienten	Seite 13
2.3. Kryokonservierung	Seite 18
2.4. Histopathologie	Seite 24
2.5. Statistische Auswertung	Seite 26
3. Ergebnisse	Seite 27
3.1. Klinische Falldaten	Seite 27
3.2. Durch Kryokonservierung hervorgerufene Schädigungen	Seite 31
3.3. Schädigungen des Endothels	Seite 33
3.4. Degeneration der Media	Seite 34
3.5. Immunhistochemische Merkmale	Seite 36
3.6. Rejektion	Seite 37
3.7. Arteriosklerose	Seite 40
4. Diskussion	Seite 43
4.1. Schäden durch Kryokonservierung	Seite 43
4.2. Vorbestehende pathologische Schädigungen	Seite 46
4.3. Ursachen für das Versagen des Gefäßtransplantates	Seite 48
4.4. Studienlimitation	Seite 50

5. Zusammenfassung	Seite 51
6. Literatur	Seite 54
7. Anhang	Seite 62
7.1. Abkürzungsverzeichnis	Seite 62
7.2. Abbildungsverzeichnis	Seite 63
7.3. Tabellenverzeichnis	Seite 65
7.4. Lebenslauf	Seite 66
7.5. Selbstständigkeitserklärung	Seite 68
7.6. Danksagung	Seite 69

Histomorphologische Evaluation arterieller Allografts nach Kryokonservierung

Monique Pötzsch

Einleitung: Kryokonservierte arterielle Allografts von hirntoten Organspendern werden vor allem zur Gefäßrekonstruktion in der Tumorchirurgie, in der Ausschaltung von Aneurysmen, als Therapieoption bei infizierten alloplastischen Gefäßprothesen, zur Ausschaltung aorto-enterischer Fisteln und bei traumatischen Gefäßverletzungen verwendet. Diese Arbeit untersuchte und verglich systematisch die histopathologische Morphologie arterieller allogener Gefäßersätze vor und nach Kryokonservierung und in 6 Fällen nach Explantation des Gefäßtransplantates.

Methoden: Es handelte sich um eine retrospektive Studie mit 40 Patienten, die einen arteriellen Gefäßersatz erhielten. Hierbei wurden 45 chirurgische Eingriffen zwischen Dezember 2001 und Januar 2007 durchgeführt. Die arteriellen Allografts wurden vor (T0) und nach Kryokonservierung (T1) und in 6 Fällen nach Explantation (T2) histopathologisch mittels histochemischer Routinefärbungen und immunhistologischer Färbungen beurteilt und mit dem klinischen Verlauf in Korrelation gesetzt. Gegenstand dieser Arbeit war die Identifizierung von möglichen Schäden, die durch die Kryokonservierung von arteriellen allogenen Gefäßersätzen entstanden sein könnten.

Ergebnisse: Es konnten keine eindeutigen durch Kryokonservierung hervorgerufenen Schäden nachgewiesen werden. In den T2-Proben zeigten sich vor allem dichte Entzündungsinfiltrate und Nekrosen der Media. Jedoch fehlten sichere Zeichen einer Rejektion. Arteriosklerose und Mediadegeneration wurden in hohem Ausmaß in den untersuchten Proben gefunden. Diese hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf. Es zeigte sich zwar ein geringer Verlust des Endothels nach Kryokonservierung (T1), dieser war aber insignifikant und hatte keinen Bezug zum postoperativen Verlauf.

Schlussfolgerung: Es empfehlen sich die folgenden histopathologischen Untersuchungen zur standardisierten Routinediagnostik arterieller Allografts: HE (Hämatoxylin-Eosin): Arteriosklerose, Entzündung, Nekrose; CD 34: prozentualer Anteil des erhaltenen Endothels; EvG (Elastica van Gieson) und Alcianfärbung: Mediadegeneration. Prospektive Studien an einem größeren Patientenkollektiv sollten bezüglich prognostischer Aussagen und histologischer Ein- und Ausschlusskriterien zur Verwendung von Spendergeweben folgen.

Schlüsselwörter: Histopathologie, Kryokonservierung, arterielle Allografts, Arteriosklerose.

Histopathological Evaluation of Cryopreserved Arterial Allografts

Monique Pöttsch

Introduction: Cryopreserved arterial allografts from brain-dead organ donors are used for reconstructive tumor surgery, in the field of infected synthetic grafts, in the management of aneurysm, aorto-enteric fistulas and vascular complications after accidents. This study systematically examined and compared the histopathology of arterial allografts before cryopreservation (T0), after thawing before implantation (T1) and in 6 cases after removal for graft failure.

Methods: This retrospective study included 40 patients receiving cryopreserved arterial allograft in a total of 45 surgical procedures between December 2001 and January 2007. The arterial allografts had been examined histopathologically before cryopreservation (T0), after thawing (T1) and after implantation in 6 cases of revision surgery because of complications (T2). Additional histochemical and immunohistochemical stainings were performed and the histological observations were correlated with clinical outcome of the patients. To identify cryopreservation associated damages was the object of this study.

Results: No certain cryopreservation associated damages could be defined in this study. The T2-samples showed dense infiltrates of neutrophil granulocytes and lymphocytes and extensive necrosis of the media, but no certain signs of graft rejection. Advanced atherosclerosis and degeneration of the media were found in the examined samples. But these features had no influence on the clinical outcome. The extent of endothelial lining was insignificantly reduced after cryopreservation, which did not impair the clinical course.

Conclusion: Following histochemical and immunohistochemical stains could be helpful to examine and describe arterial allografts: H&E (Hematoxylin and eosin): atherosclerosis, inflammation, necrosis; CD34: endothelial lining; EvG (Elastica van Gieson) and Alcian Blue: degeneration of the media. Larger prospective studies will be required in order to define prognostic features and inclusion or exclusion criterias for cryopreserved arterial allografts.

Key words: histopathology, cryopreservation, arterial allografts, atherosclerosis.

1. Einleitung

1.1. Geschichtliches

Gefäßallografts sind Transplantate humaner Blutgefäßsegmente, die zum Ersatz krankhaft veränderter Gefäße wie zum Beispiel bei pAVK beziehungsweise AVK, infizierter Aneurysmen, traumatischer wie iatrogenen Gefäßverletzungen und im Rahmen der Tumorchirurgie zum Einsatz kommen. In Deutschland wird für die Transplantation von Organen und Geweben von einem genetisch differenten Individuum derselben Spezies der Begriff Homotransplantat beziehungsweise Homograft verwendet. Im angloamerikanischen Sprachgebrauch und verstärkt nun auch im deutschsprachigen Raum findet der Begriff des Allotransplantates beziehungsweise Allografts Verwendung. Dem gegenüber bezeichnet eine Xenotransplantation eine Übertragung von Geweben und Organen zwischen Individuen unterschiedlicher Spezies und eine Autotransplantation die Verpflanzung von Geweben eines Individuums von einem Ort an einen anderen Ort desselben Wirts [Riede 2001, Bühling 2004]. In dieser Arbeit wird daher der einheitliche Begriff des Allografts gebraucht.

Die ersten Versuche, arterielle Allografts zur Gefäßrekonstruktion zu verwenden, wurden bereits in der Zeit um den Ersten Weltkrieg vorgenommen [Callow 1996]. 1912 veröffentlichte Carrell eine Studie, in der er über die 2-Jahres-Offenheitsdauer eines venösen Allografts berichtete, welchen er in die thorakale Aorta eines Hundes implantierte [Carrell 1912]. Im selben Jahr erhielt er den Nobelpreis für Medizin für seine Arbeit in dem Gebiet der Gefäß- und Transplantationschirurgie. Jedoch gelang erst Gross und Mitarbeitern 1948 die erfolgreiche Verwendung eines Gefäßallografts bei einer Aortenisthmusstenose [Gross 1948]. 1950 verwendete Jaques Oudot einen Allograft zur Überbrückung einer thrombosierten Aortenbifurkation. Ein Jahr später wurde ein Aortenaneurysma durch die Verwendung eines Gefäßallografts therapiert. Der Arzt, dem diese Operation gelang, war Charles Dubost, der auch die erste Nierentransplantation in Europa durchführte [Dubost 1950, Larena-Avellaneda 2007, Callow 1996]. Unabhängig von diesem o.g. Eingriff führte auch Oudot zu jener Zeit erstmalig einen Ersatz der abdominellen Aorta mit allogenen Material durch [Oudot 1951]. Außerdem wurde 1951 die erste Gefäßbank Europas für homologe Leichenarterien von R. Fontaine gegründet.

Bis zur klinischen Einführung von alloplastischen Gefäßprothesen waren die allogenen Gefäßersatz in den 1950er Jahren die Therapieoption der Wahl bei Gefäßrekonstruktionen.

Anfänglich wurde vor allem venöses und arterielles frisches Gewebe verwendet. Es etablierten sich so genannte Homograft-Banken, um ein größeres Angebot zu erzielen. Durch den steigenden Bedarf an arteriellen und venösen Allografts wurde die längere Konservierung dieses Materials zu einem zunehmenden Problem, so dass auch in dem Bereich der künstlich hergestellten Materialien die Entwicklung weiter vorangetrieben wurde.

Die Konservierung bei +4°C limitierte die Haltbarkeit auf etwa 4 Wochen. Somit bestand nicht genügend Zeit, um laborchemische Untersuchungen zur AB0- und HLA-Kompatibilität und zur Testung von Infektionskrankheiten zu jener Zeit durchzuführen. Außerdem manifestierten sich nach und nach Komplikationen wie Aneurysmabildungen, Graftthrombosen und Kalzifizierungen, die unabhängig von der verwendeten Konservierungsmethode auftraten. Durch den klinischen Einsatz von Polyethylenterephthalat (Polyester, Dacron) im Jahre 1958 und Polytetrafluorethylen (PTFE, Goretex) im Jahre 1975 wurden die allogenen Gefäßersatzteile nahezu verdrängt. Aber auch durch die venösen autologen Gefäßersatzteile gelangten die homologen Arterien in Vergessenheit. So ist die autologe Vene für schmalkalibrige Gefäßersatzteile auch heute noch das Material der Wahl [Larena-Avellaneda 2007].

Jedoch werden heutzutage wieder zunehmend arterielle und venöse allogene Grafts verwendet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der heutige Patient zunehmend älter und multimorbide ist und somit autologe Venen in vorangegangenen Operationen für Bypässe in der Kardio- und Gefäßchirurgie bei koronarer Herzkrankheit und arterieller Verschlusskrankheit bereits eingesetzt wurden und somit nicht mehr zur Verfügung stehen. Außerdem konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die allogenen Gefäßersatzteile resistenter gegenüber Infektionen im Vergleich zu künstlichen Gefäßprothesen sind [Vogt 1996, Goffin 1998, Mestres 1995, Knosalla 1996], so dass dieser Gefäßersatzteil zunehmend bei infizierten künstlichen Gefäßprothesen als Therapieoption wieder zum Einsatz kommt. Ein anderer Aspekt ist die Anwendung des allogenen Materials bei immunsupprimierten Patienten nach Organtransplantation. So beschrieb da Gama 1994 in einer Studie den Gebrauch von Gefäßallografts bei Patienten mit immunsuppressiver Behandlung nach Organtransplantation. Bei 13 Patienten nach Nierentransplantation unter Immunsuppression wurden allogene Gefäße im infrarenalen Stromgebiet angewandt. Die Studie zeigte auch nach durchschnittlich 20 Monaten Beobachtung keine Graftinsuffizienz [da Gama, 1994].

In der heutigen Zeit hat sich die längerfristige Konservierung des allogenen Gefäßersatzes verbessert und wurde weitestgehend standardisiert, so dass die Verwendung dieses Materials auch in Zukunft ihren Einsatz findet.

Zudem besteht auch für Kliniken beziehungsweise Abteilungen, die keine eigene Homograft-Bank besitzen, die Möglichkeit allogenes Gefäßmaterial über die European Homograft Bank in Brüssel innerhalb weniger Tage zu beziehen.

1.2. Indikationen zur Verwendung arterieller Allografts

Zum klinischen Einsatz kommt das allogene Material vor allem wie bereits o.g. beim Ersatz von infizierten Kunststoffprothesen [Lesèche 2001, Brown 2009, Gabriel 2004, Noel 2002, Eugène 1998, Wagstaff 1996, Nevelsteen 1995, Nevelsteen 1998].

Die Infektion ist auch aktuell noch eine der häufigsten Komplikationen der modernen Gefäßchirurgie, die mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Die derzeitigen Infektionsraten liegen zwischen 0,5 bis 5%. Die Spannbreite ergibt sich durch die unterschiedliche anatomische Lage des Eingriffes. Dabei ist ein deutlich höheres Infektionsrisiko mit Eingriffen in der Peripherie und der Leiste assoziiert und ein geringeres bei aortalen Eingriffen [DGG Leitlinien, 2008].

Aber auch bei Aortenaneurysmen, zur Rekonstruktion von Gefäßen bei malignen Erkrankungen mit Gefäßeinbruch, bei Gefäßrekonstruktionen nach Organtransplantationen und in seltenen Fällen zur Gefäßrekonstruktion bei Patienten mit Gefäßverletzungen nach Polytraumata werden die arteriellen Allografts wieder vermehrt eingesetzt [da Gama 1994, Lesèche 2001, Kieffer 2004, Settmacher 2004, Gomez-Caro 2008, Brown 2009].

Vogt untersuchte in einer Studie die Morbidität und Mortalität bei 18 Patienten, die zum größten Teil nur einen partiellen allogenen Gefäßersatz bei infizierten künstlichen Prothesen der thorakalen und abdominellen Aorta erhielten. Diese Eingriffsart konnte natürlich nur bei begrenzt lokalisierten Infektionen vorgenommen werden. Es zeigte sich, dass gerade durch die geringere Invasivität des chirurgischen Eingriffs mit oder ohne kompletten Ersatz der Prothese und unter Verzicht auf komplexe extra-anatomische Gefäßrekonstruktionen, die vor allem für die hohe Morbidität und Mortalität verantwortlich sind, gute Kurzzeitergebnisse und eine akzeptable Mortalität von 11% erzielt werden konnten [Vogt 1999]. In einer weiteren Studie konnten auch gute Ergebnisse bei der Verwendung von kryokonserviertem allogenen Material bei Patienten mit mykotischen Aneurysmen und infizierten Gefäßprothesen aufgezeigt werden. Dabei kam es zu einer 30-Tage-Mortalität von 6% in einem Kollektiv von 49 Patienten [Vogt 2002]. Auch in einer weiteren prospektiven Studie über einen Zeitraum von 8 Jahren konnten gute

Langzeitergebnisse beziehungsweise gute mittelfristige Ergebnisse bei 28 Patienten, die bei primären oder Prothesen-assoziierten Infektionen der abdominellen Aorta einen allogenen Gefäßersatz erhielten, aufgezeigt werden. Die Mortalität lag bei 17,8%. Außerdem gab es keine persistierenden oder rezidivierenden Infektionen während des Observierungszeitraumes, so dass die Arbeitsgruppe von Guy und Mitarbeitern zu dem Ergebnis gekommen war, dass der Gefäßersatz mit allogenum Material eine nützliche Alternative bei infizierten Gefäßen darstellt [Guy 2001].

In einem Fallbericht von 1998 konnte bei einem 56-jährigen Patienten mit pAVK ein gutes Kurzzeitergebnis nach 3 Jahren nach aorto-bifemoraler Anlage eines allogenen Gefäßersatzes nach infiziertem Bypass aufgezeigt werden. Der Patient hatte initial 1984 einen aorto-bifemoralen Dacron-Bypass erhalten. Nach mehreren Re-Infektionen und Re-Operationen (wie zum Beispiel 1994 Erhalt eines bilateralen axillo-femorales Bypasses) wurde 1995 eine aorto-femorale Rekonstruktion mittels kryokonserviertem allogenum Gefäßersatz durchgeführt. Nach 3 Jahren waren keine Zeichen einer Infektion und auch keine degenerativen Veränderungen nachweisbar [Schroeder 1998].

Die hohe und besserer Resistenz der allogenen Gefäßersatzes gegenüber Infektionen beziehungsweise Re-Infektionen ergaben auch schon vorangegangene experimentelle Studien verschiedener Forschungsgruppen [Kieffer 1993, Koskas 1996, Vogt 1997, Knosalla 1996, Knosalla 1998].

Die Methoden zur Konservierung und Lagerung der Gefäßtransplantate haben sich seit den 1950er und 1960er Jahren verbessert. Damals wurde meist frisches Gewebe von hirntoten Organspendern verwendet. Heute kommen zum größten Teil kryokonservierte allogene Gefäßersatzes zum Einsatz.

1.3. Konservierung und Lagerung von Allografts

Es gibt Untersuchungen zur protektiven Wirkung der Kryokonservierung auf immunologische Prozesse, die den klinischen Verlauf des Patienten, der ein allogenes Gefäßtransplantat erhielt, verbessern [Motomura 1995, Callow 1996, Kieffer 2004]. Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Kryokonservierung auch zu Strukturveränderungen im Gefäß und damit zum Verlust beziehungsweise zur Verminderung der Integrität des Gewebes führen [Lehalle 1997, Langerak 2001]. Letztlich wurden verschiedene Untersuchungsergebnisse beschrieben, wobei

sich die mechanische Komponente der arteriellen Allografts nach Kryokonservierung nicht wesentlich von der der frischen Allografts unterschied [Langrak 2001].

Durch die Kryokonservierung von allogenen Gefäßersätzen wurden so genannte Homograft-Banken geschaffen, die zu einer höheren Verfügbarkeit dieser Materialien, zur Verbesserung und Standardisierung des Konservierungsverfahrens und Lagerung und letztendlich zu einer Etablierung dieser Therapieoption führten [Langerak 2001]. In den 1950er wurden gekühlte venöse und arteriell allogene Gefäßersätze ohne Blutgruppenkompatibilität verwendet. Heutzutage werden hauptsächlich blutgruppenkompatible allogene Gefäßersätze zur Individualitätswahrung transplantiert. Die Wichtigkeit der AB0-Kompatibilität konnten unter anderem Fischlein und Mitarbeiter in einer Untersuchung an kryokonservierten homologen Aortenklappen 1995 aufzeigen. Es gab 3 Gruppen, die sie untersuchten. In der Gruppe I erhielten die Patienten AB0-kompatible Aortenklappen-Allografts. Die Patienten der Gruppe II erhielten AB0-inkompatible Aortenklappenersätze. In der Gruppe III wurden Patienten eingeschlossen, die Xenotransplantate erhielten. Eine signifikant höhere Aktivität von immunologischen Zellen im Blut konnte in der Gruppe II nachgewiesen werden [Fischlein 1995]. Daraus folgt, dass die Antigenität geringer ist, wenn blutgruppenkompatibel transplantiert wird. Dies konnten bereits Ochsner und Mitarbeiter 1971 feststellen [Ochsner 1971].

Die HLA-Kompatibilität nimmt bei der Implantation eines allogenen Gefäßersatzes eine untergeordnete Stellung ein und wird vernachlässigt. Zum einen wird davon ausgegangen, dass der Prozess der Kryokonservierung zu avitalen Gefäßallografts führt, die keine Antigenität mehr aufweisen [Boren 1978]. Zum anderen wurde jedoch in den letzten Jahren bewiesen, dass die allogenen Gefäßersätze zum großen Teil funktionsfähige Zellen aufweisen, welche einen wichtigen Aspekt für die Lebensdauer dieses Gefäßersatzes darstellen. So haben die Endothelzellen eine Vielzahl von Aufgaben, wie zum Beispiel die Produktion des Gewebsplasminogenaktivators (tPA), der für die Fibrinolyse unerlässlich ist [Gournier 1993]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Cochran und Mitarbeitern an frischen und kryokonservierten Aortenklappen-Allografts am Ratten-Modell aufzeigen, dass die Kryokonservierung nicht die Antigenität des Allografts aufhebt [Cochran 1989]. Auch Grauss und Mitarbeiter postulierten, dass die HLA-Kompatibilität wichtig ist [Grauss 2003]. Außerdem konnten Mirelli und Mitarbeiter in ihrer Untersuchung an frischen arteriellen Allografts feststellen, dass eine signifikant erhöhte Antikörper-Aktivität gegen HLA Klasse I- und II-Antigene im Blut des Empfängers nach Implantation eines arteriellen Allografts, wie dies bei Rejektionen beschrieben wird, vorlag [Mirelli 1999]. Trotz dieser Ergebnisse werden arterielle allogene Gefäßersätze gewöhnlich nicht HLA-kompatibel transplantiert, da es noch zu wenige

Langzeitergebnisse zum klinischen Verlauf der Patienten in Bezug zu einer chronischen Rejektion gibt.

Durch das steigende Interesse an diesen Materialien wurden verschiedene Konservierungsmethoden entwickelt. Zum einen wurden die allogenen Gefäße in einer +4°C kalten Lösung aufbewahrt. Eine andere Methode war die Tiefkühlagerung bei -20°C und die Lyophilisation (Gefriertrocknung). Allerdings war durch die verschiedenen Methoden, außer bei der Lagerung bei +4°C, die Viabilität nicht mehr sicher nachweisbar. Des Weiteren war die Lagerung im gekühlten Zustand unzureichend hinsichtlich der zeitlichen Komponente [Eastcott 1950, Marrangoni 1951]. Konkrete Angaben über die maximal mögliche Dauer der Lagerung und damit der Haltbarkeit der Gefäßallografts im kryokonservierten Zustand ist der derzeitigen Literatur nicht zu entnehmen. Es gibt Angaben über die Verwendung des arteriellen allogenen Materials zwischen 30 Tagen und 3 Monaten im kryokonserviertem Zustand, aber auch längere Zeitspannen werden beschrieben [Langerak 2001, Buján 2000, Bateson 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurden die allogenen Gefäßersätze in den meisten Fällen nicht länger als ein Jahr kryokonserviert, aber es wurden auch in einigen Fällen nach einer Kryokonservierungsdauer von bis zu drei Jahren allogene Gefäßersätze implantiert. Dies erfolgte nach makroskopischer Begutachtung des Zustands des nach Kryokonservierung aufgetauten arteriellen Allografts.

1.4. Fragestellung

Obwohl hinsichtlich histomorphologischer Auswirkungen der Kryokonservierung einige Studien an humanen Herzklappen veröffentlicht wurden [Wassenaar 1995, Nagasaka 2005] und es auch Studien über den klinischen Verlauf nach Transplantation von arteriellen Allografts gibt [Lesèche 2001], liegen bisher keine Untersuchungen vor, die eine standardisierte histopathologische Beschreibung von arteriellen Allografts beinhalten und mit dem klinischen Verlauf korrelieren.

Daher versucht die vorliegende Arbeit sowohl die Erhebung einer standardisierten histopathologischen Begutachtung von arteriellen Allografts als auch den klinischen Verlauf in Bezug zu den histomorphologischen Untersuchungsergebnissen zu setzen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Werden durch die Kryokonservierung Gewebeveränderungen verursacht und können diese durch die pathologische Routinediagnostik identifiziert werden?
2. Welche weiteren Gefäßläsionen, abgesehen von eventuellen Schäden durch Kryokonservierung, lassen sich diagnostizieren?
3. Welche histopathologischen Untersuchungen sollten zur Detektion dieser Schäden routinemäßig durchgeführt werden?
4. Welche Komplikationen traten im klinischen Verlauf nach dem arteriellen Gefäßersatz auf?
5. Welche Veränderungen bei Allograftversagen können nach der Explantation erkannt werden?
6. Worauf lassen sich eventuelle Komplikationen zurückführen? Als mögliche Einflussfaktoren sollen untersucht werden:
 - a. Transplantatrejektion
 - b. Infektion des Operationsgebietes
 - c. Vorschädigung des arteriellen Allografts durch Arteriosklerose
 - d. Eventuelle Schäden durch Kryokonservierung
7. Sind aus den vorgenannten Punkten Rückschlüsse auf die Lebensdauer und die Grenzen, der Verwendung von arteriellen Allografts zu ziehen?

2. Methoden

2.1. Studiendesign

Wir führten eine retrospektive Studie durch, in der histologische Präparate reevaluiert und mit den klinischen Daten korreliert wurden. Zur Verfügung standen formalinfixierte und in Paraffin eingebettete arterielle Allografts, die zur histopathologischen Beurteilung vor Kryokonservierung (Zeitpunkt T0), nach dem Auftauprozess (Zeitpunkt T1) und in einigen Fällen nach Explantation im Rahmen von Revisionsoperationen bei Auftreten von Komplikationen (Zeitpunkt T2) in die Pathologie, Charité Campus Mitte, eingeschickt worden waren.

Es wurden verschiedene histochemische und immunhistologische Färbungen an den archivierten Geweben durchgeführt. Die histomorphologischen Auswertungen wurden mit den klinischen Daten der Patienten, die ebenfalls retrospektiv mithilfe der archivierten Krankenakten erhoben wurden, korreliert.

Es handelte sich vor allem um großkalibrige abdominelle Gefäße wie der Aorta abdominalis und der Iliacalabelung.

2.2. Patienten

Das Kollektiv setzte sich aus 40 Patienten, die in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum Berlin, zwischen Dezember 2001 und Januar 2007 einen arteriellen Gefäßersatz erhalten hatten, zusammen.

Das durchschnittliche Alter des Patientenkollektivs betrug zum Zeitpunkt der Allograft-Implantation 61 Jahre (min. 8 Monate, max. 85 Jahre, Standardabweichung 16,2). Es bestand aus 6 weiblichen und 34 männlichen Patienten. Die Indikationen zum arteriellen Gefäßersatz waren vielfältig. Jedoch kamen die arteriellen Allografts vor allem bei infizierten Kunststoffprothesen zum Einsatz (n=18), aber auch bei Aneurysmen (n=5), in der Leberchirurgie (n=4), bei gefäßinvasiven Pankreastumoren mit dem Ziel einer R0-Resektion (n=7), bei Aorto-enterischen Fisteln (n=5), bei einem Chondrosarcom (n=1) und bei einem polytraumatisierten Patienten mit Aortenverletzung (n=1).

Von diesen Operationen waren 13 elektive Eingriffe und bei 9 handelte es sich um Notfalleingriffe. Bei den anderen Fällen konnte diese Zuordnung nicht mit Genauigkeit retrospektiv erhoben werden. Jedoch kann anhand der Eingriffsart eine gewisse Dringlichkeit beziehungsweise Eingriff mit aufgeschobener Dringlichkeit postuliert werden.

Tabelle 1: Indikationen und Art bzw. Lokalisation des Eingriffs

Fall	Indikation	Eingriff/-lokalisierung	Dringlichkeit
1	Aortointestinale Fistel	Aorta	Notfall
2	V. portae-Hypoplasie	Leber	elektiv
3	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv
4	Aneurysma, Lebertransplantation	Leberarterie	
5	Aortoduodenale Fistel	Aorta	dringlich
6	pAVK	Femoro-poplitealer Bypass	
7	LAS	Leberarterie	
8	Pankreastumor	Whipple-Operation	
9	Aneurysma spurium	Iliaco-femoraler Bypass	Notfall
10	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv
11	pAVK	Popliteo-fibularer Bypass	
12	Aneurysma spurium	A. femorales communes-Ersatz	
13	Infektion	A. femorales communes Ersatz	Notfall
14	Infektion	Aorta	elektiv
15	Infektion	A. femorales profunda-Ersatz	elektiv
16	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv
17	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv
18	Infektion Prothese	Aorta	elektiv
19	Infektion Prothese	Aorta	
20	Infektion/ Blutung	Femoralisgabelrekonstruktion	Notfall
21	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv
22	BAS	A. femorales communes Patch	
23	Infiziertes Aneurysma spurium	A. fem. com. et superficialis-Ersatz	
24	Infektion Bypass	A. femoraler-poplitealer Ersatz	
25	Infektion Bypass mit Blutung	A. femorales communes Patch	Notfall
26	LAS	Leberarterie	
27	Mykotisches Aneurysma	Leberarterie	
28	Pankreastumor	Whipple-Operation	elektiv

29	Chondrosarkom	Iliakalersatz	
30	Truncus coelicus-Verschluss	Truncusrekonstruktion	Notfall
31	Traumatische Aortenverletzung	Aorta	Notfall
32	Aortoduodenale Fistel	Aorta	Notfall
33	Infektion Prothese	Aorta	elektiv
34	Infektion Prothese	Aorta	elektiv
35	Infektion Prothese	Aorta	elektiv
36	Aneurysma solum	Iliakalersatz	
37	Infektion Bypass	Femoro-poplitealer-Bypass	
38	Infektion Bypass	Popliteo-tibialer-Bypass	
39	Aortoduodenale Fistel/Infektion	Aortoaortaler Allograft-Bypass	
40	Infizierter Cross-over-Bypass	Aorto-femoraler Bypass/Allograft-Patch	
41	Infektion Bypass	Cross-over-Bypass links→rechts	
42	Infektion Bypass	Aortobifemoraler Bypass	
43	Infektion Prothese	Femoroprofundaler Bypass	
44	Aortoduodenale Fistel	Aortobifemoraler Bypass	
45	Infektion Prothese	Femoro-poplitealer Bypass	

Die Patienten erhielten nur nach Aufklärung in den operativen Eingriff mit zusätzlicher Einwilligung zur Verwendung eines arteriellen Allografts einen solchen Gefäßersatz. Ausgeschlossen waren die Notfalloperationen. In diesen Fällen erfolgte die Aufklärung nach dem operativen Eingriff.

Eine standardisierte antibiotische beziehungsweise antimykotische Therapie erfolgte nicht. Bei infizierten künstlichen Gefäßprothesen wurde einerseits die schon bestehende antimikrobielle Therapie intraoperativ fortgeführt oder aber bei noch fehlender antimikrobieller Therapie eine 5- bis 7-tägige kalkulierte Therapie mit einem Cephalosporin der dritten Generation bis zum Erhalt eines Resistogramms mit darauf folgender resistenzgerechter Umstellung der antimikrobiellen Therapie begonnen. In den anderen hier aufgeführten Fällen, unabhängig einer bestehenden Infektion, erfolgte die intraoperative Gabe einer Einzeldosis eines Cephalosporins intravenös als Kurzinfusion (in diesem Patientenkollektiv in den meisten Fällen 1,5 g Cefuroxim).

Zudem erfolgte keine standardisierte immunsuppressive Therapie bei Erhalt eines arteriellen Allografts. Dies wurde nur im Fall einer Organtransplantation, in dieser Studie bei Lebertransplantationen, routinemäßig mit Tacrolimus durchgeführt. Eine therapeutische Antikoagulation wurde allein aufgrund der Gefäßtransplantation in den meisten Fällen nicht als

notwendig erachtet, war aber bei klinisch relevanten Nebendiagnosen, wie zum Beispiel Vorhofflimmern, indiziert. Es erfolgte somit nur eine prophylaktische Antikoagulation mit unfraktioniertem (bei Niereninsuffizienz) oder niedermolekularem Heparin.

Auch die Anzahl der operativen Eingriffe des Patientenkollektives waren variabel. So wurde zum Beispiel ein Patient zweimal, ein anderer fünfmal operiert, so dass insgesamt 45 arterielle Allografts begutachtet werden konnten. Des Weiteren wurde hierbei in 2 Fällen ein Gefäßersatz vom selben Spender für 2 unterschiedliche Empfänger (Fall 28 und Fall 30) verwendet.

Der Nachbeobachtungszeitraum der Patienten wurde bis Mai 2008 durchgeführt. 18 Patienten starben während dieser Nachbeobachtung. 15 Patienten von ihnen starben an den Folgen ihrer primären Erkrankung, die zum Gefäßersatz führte, und 3 starben an anderen Ursachen, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem arteriellen Gefäßersatz beziehungsweise mit der primären Erkrankung vergesellschaftet waren. 4 Patienten wurden außerhalb der Charité weiterbehandelt, sodass keine zuverlässigen Informationen über den weiteren klinischen Verlauf vorlagen. 18 Patienten lebten zum Ende der Nachbeobachtungsphase. Eine klinische Sektion wurde nicht routinemäßig bei den Todesfällen durchgeführt. Jedoch wurden im Falle einer Revisionsoperation Proben des entnommenen arteriellen Allografts zur histopathologischen Untersuchung in das Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte eingeschickt (T2, n=6).

Des Weiteren wurde die Zeit vom chirurgischen Eingriff bis zum Eintritt einer Allograft-assoziierten Komplikation beziehungsweise bis zum Tod des Patienten in Tagen ermittelt. Dazu wurden sämtliche Krankenakten jedes Patienten mit besonderem Augenmerk auf angiographische, sonographische und sonstige radiologische Befunde durchgesehen, sowie nach Anhalten für eine Infektion (mikrobiologische Befunde, laborchemische Parameter) gesucht und die Daten dieser Befunde beziehungsweise eventuelle Revisionsoperationen festgehalten.

Die arteriellen Gefäßersätze wurden nach den Regeln des Deutschen Transplantationsgesetzes (DTG) den hirntoten Organspendern, die an keiner neoplastischen Erkrankung oder Infektionskrankheit litten, entnommen. Hierzu werden im Allgemeinen mobile Entnahmeteam im Auftrag der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) entsendet, die die Organe und Gewebe unter sterilen Bedingungen explantierten. Die entnommenen Gefäße wurden nach der Perfusion mit +4°C kaltem Konservierungsmedium (HTK-Lösung Histidin-/ Tryptophan-Ketoglutarat nach Bretschneider oder University of Wisconsin (UW)-Lösung nach Belzer) steril dreifach verpackt, wobei sie im Konservierungsmedium verblieben und mit +4°C kalter isotoner Kochsalzlösung im mittleren und äußeren Beutel und auf Eis zum schnellen Transport in das geeignete Klinikum, in diesem Fall das Transplantationszentrum der Charité, Campus Virchow Klinikum, verbracht wurden (Transport mit Sondersignalen). Hier erfolgte die Alarmierung des

24-Stunden-Rufbereitschafts-Transplantationsteams. Bis zum Eintreffen des Teams wurden die Gefäßallografts in einem +4°C-Kühlschrank zwischengelagert. Innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme des Gewebes erfolgte die Kryokonservierung [Kurzbeschreibung des Verarbeitungsverfahrens aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité Campus Virchow Klinikum].

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Gefäße verwendet, die an der Charité Campus Virchow Klinikum entnommen und in der dortigen Homograft-Bank aufbewahrt wurden. Es wurden hauptsächlich große arterielle Gefäße, wie die abdominelle und thorakale Aorta, die Aortenbifurkation, die Iliakalarterien aber auch Viszeralarterien und die Femoralarterien den hirntoten Organspendern entnommen und der Homograft-Bank der Charité zugeführt. Tabelle 2 zeigt einen Auszug aus der Homograft-Bank im Jahr 2003 zum Teil mit den Spendergefäßen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Tabelle 2: Auszug aus der Homograft-Bank der Charité Campus Virchow Klinikum, Stand 05.11.2003

Spender	Entnahmedatum
95646	16.08.2003
93250	05.03.2003
89633	18.06.2002
89625	18.06.2002
90703	10.09.2002
92808	30.01.2003
94772	15.06.2003
93355	11.03.2003
94340	16.05.2003
94214	07.05.2003

Nach der Entnahme wurden zunächst die routinemäßige makroskopische Begutachtung und dann die darauf folgende bakteriologische Untersuchung des Spendermaterials durchgeführt. Das steril gewonnene Material wurde mit eindeutiger Kennzeichnung und genauem Untersuchungsauftrag in das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Campus

Virchow Klinikum, gesendet. Hierbei wurden Abstriche als auch kurze Abschnitte der Gefäße, die das umliegende Gewebe umfassen, standardisiert untersucht.

Zum einen wurden die Gefäßallografts mikroskopisch betrachtet und zum anderen wurden Kulturmedien mit einer minimalen Bebrütungszeit von 3 Tagen angelegt [Hof 2005].

2.3. Kryokonservierung

Die thorakale und abdominelle Aorta, die Aortenbifurkation, die Iliakalarterien, die Femoralarterien und die Viszeralarterien wurden in ihrer gesamten Länge für maximal 24 Stunden in einem Medium (RPMI-1640, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) bei +4°C gelagert. Dieses Medium besteht aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen und benutzt ein Hydrogencarbonat-Puffersystem. Ferner besteht es aus einem Serum, welches Spurenelemente für die vitalen Zellen enthält. Das Zellkulturmedium RPMI-1640 wird im Allgemeinen auch erfolgreich bei der Anzucht von humanen und neoplastischen Leukozyten und einer Vielzahl von anderen Zellkulturen angewendet.



Abbildung 1: RPMI-1640 Medium

Danach erfolgte die makroskopische Begutachtung der Gefäße. Hierbei wurde vor allem auf arteriosklerotische Veränderungen, Nekrosen und Rupturen geachtet. Nach Ausschluss solcher eventueller Beschädigungen wurden Abschnitte der Gefäße von einer Länge zwischen 5mm bis 20mm sowohl vom kranialen als auch vom kaudalen Ende des Gefäßes entnommen und in 4%igem Formalin als Fixiermittel zur histopathologischen Untersuchung (T0) in das Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, eingeschickt. Diese Proben beinhalteten alle Wandschichten der Arterien sowie einen wechselnd breiten Saum des umliegenden Fett- und Bindegewebes. Der Zeitpunkt dieser Gewebeuntersuchung, direkt nach Entnahme aus dem Spender und vor Kryokonservierung, wurde als Zeitpunkt T0 bezeichnet. Anschließend wurden die Gefäße unter sterilen Bedingungen mittels chirurgischer Instrumente präpariert, um diese von dem umliegenden Gewebe zu befreien und danach in ein sogenanntes Cryoprotectant-Medium (DiMethyl-Sulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) zu überführen. Es gibt sowohl Berichte in der Literatur über die Anwendung von 10%-, 12,5%- und 15%-igen Konzentrationen [Buján 2000]. Jedoch konnte bei der 15%-Konzentration von DMSO eine Beeinträchtigung der Kontraktions- und Relaxationsfunktion des allogenen Gefäßersatzes beobachtet werden [Bateson 1994]. In unserer Arbeit wurden daher 10%ige und 12,5%ige Konzentrationen des DMSO verwendet.



Abbildung 2: Frisch entnommene allogene Blutgefäße in der Konservierungslösung

Die Gefäße wurden mit folgenden Angaben als Fertigarzneimittel etikettiert, um das enthaltene Material eindeutig zu identifizieren:

- Human-Blutgefäß, kryokonserviert, Charité, Transplantat humanen Ursprungs, kryokonserviert
- Humane –*Art des Blutgefäßes*-, kryokonserviert
- Inhalt: 1 Stück
- Zur Transplantation
- Arzneimittel für Kinder unzugänglich aufbewahren
- Verschreibungspflichtig
- Lagertemperatur: kleiner/ gleich -160°C
- Genehmigungsnummer
- Ch.-B.:
- Herstellungsdatum:
- Verwendbar bis/ Exp.-Date:
- Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin
- Ident.-Nr.:
- Spender-Nr.:
- Länge in mm
- Durchmesser in mm

Außerdem wurden wie oben beschrieben Proben für die mikrobiologische Untersuchung entnommen und in das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Campus Virchow Klinikum, gesendet. Darauf folgte der Gefriervorgang.

Die Kryokonservierung erfolgte in einem separaten Raum, der die entsprechenden Sicherheitsmerkmale eines Flüssigstickstofflagers mit rutschfestem Fußboden (R9 oder höhere), einem Sauerstoffkonzentrationsmessgerät, welches akustisch und visuell alarmiert, wenn die Sauerstoffkonzentration einen kritischen Wert unterschreitet, und einer selbstschließenden Tür, erfüllte. Hierbei wurde das Gefäßtransplantat bis zu einer Zieltemperatur von -196°C innerhalb etwa einer Stunde in einem Einfrierprogramm mittels Flüssigstickstoff und einem Freezer (SyLab, Neupurkersdorf, Österreich) gefroren.

Beim schnellen Absenken der Temperatur mittels des Freezers gefriert das intra- und interzelluläre Gewebewasser. Dieser Punkt wird als Kristallisationspunkt bezeichnet: dies

bedeutet, dass der flüssige in einen festen Aggregatzustand wechselt. Chemisch herrscht im Kristallgitter eine größere Ordnung als in Flüssigkeit, sodass die Entropie kurzzeitig sinkt und dadurch Wärme freigesetzt wird, bevor es zum endgültigen Gefriervorgang kommt. Dadurch werden bereits gefrorene Strukturen wieder erwärmt und andere Strukturen vom Einfrieren gehindert. Diese Verzögerungen können zum Abtöten von Zellen führen. Ziel ist es also, eine gezielte Kühlung am Kristallisationspunkt zu erreichen, um die Wärmefreisetzung zu verhindern. Dies erfolgt mittels eines programmierbaren Freezers wie oben genannt. Mithilfe zweier Magnetventile zieht sich der Freezer den benötigten Flüssigstickstoff und erhält somit die voreingestellte Kammertemperatur.

Die Ist-Temperatur wird dabei mit einem Messfühler ermittelt. Im Durchschnitt werden die Proben mit einer Kühlrate von 1.2 bis 1.5K/min gefroren [R. Eisele, Manual Cryokonservierung].



Abbildung 3: Anordnung des Freezers mit Flüssigstickstoff in der Charité, Campus Virchow Klinikum, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Nach diesem Vorgang wurden die arteriellen Allografts in so genannte Aufbewahrungsbehälter verbracht, die wiederum zur weiteren Lagerung im Flüssigstickstofftank in der Flüssigphase bei etwa -150 bis -160°C eingefroren wurden. Die Spannweite der Temperatur ergibt sich aus der im Flüssigstickstofftank bestehenden unteren flüssigen Phase, welche -196°C beträgt, und der oberen gasförmigen Phase, die eine höhere Temperatur aufweist. Der Messfühler misst in der gasförmigen Stickstoffphase die Ist-Temperatur, so ergibt sich die Temperaturspannweite -150 bis -160°C. Diese Behältnisse sind stark isoliert und können somit die Tieftemperatur im Inneren möglichst lange ohne erneuten Flüssigstickstoffnachschub halten. Ein wichtiger Aspekt ist die detaillierte Beschriftung des Gefäßallografts und die Einpflegung des Aufenthaltsortes in eine Datenbank, um ein schnelles Auffinden des passenden Gefäßtransplantates zu ermöglichen.



Abbildung 4: Aufbewahrungsmaterial der Allografts

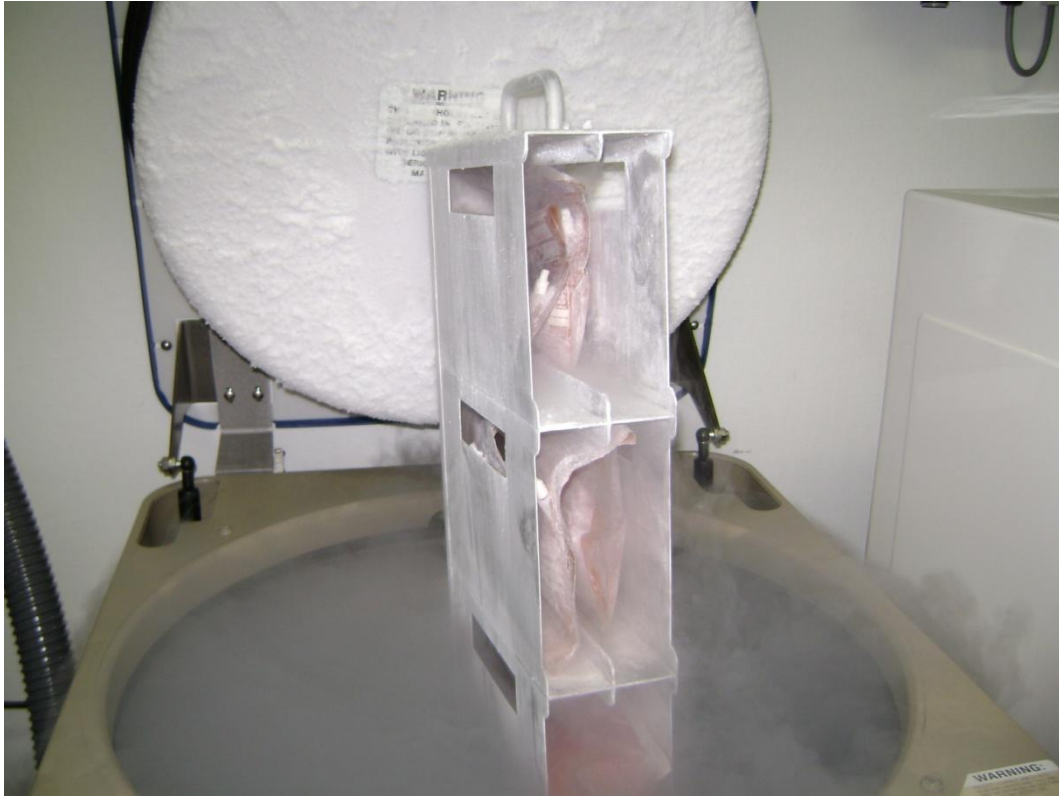


Abbildung 5: Aufbewahrungsbehältnisse der Allografts

Die in unserer Studie verwendeten arteriellen Gefäßersatzstücke wurden für mindestens einen Tag bis maximal 1063 Tage kryokonserviert. Die Gefäße wurden erst kurz vor dem chirurgischen Eingriff in einer +37°C warmen Kochsalzlösung aufgetaut und während der Operation für den benötigten Bereich präpariert.

Das restliche, zur Transplantation nicht mehr benötigte, Gewebe wurde wiederum in 4% Formalin fixiert und zur histopathologischen Untersuchung in das Institut für Pathologie gesendet. Dieser Zeitpunkt wurde als T1 bezeichnet.

Für die Transplantation wurden HLA-Merkmale nicht berücksichtigt. Jedoch wurden die arteriellen Gefäßersatzstücke AB0-kompatibel transplantiert.

In 6 Fällen gab es postoperative Komplikationen, die zu einer Revisionsoperation und zur Explantation des arteriellen Allografts führten. Die hierbei anfallenden explantierten Gefäßtransplantate wurden wiederum in 4% Formalin zur histopathologischen Begutachtung in das Institut für Pathologie gesendet, dieser Zeitpunkt wurde als T2 bezeichnet.

2.4. Histopathologie

Die Proben der Gefäße T0, T1 und T2 wurden mit Hilfe eines standardisierten Automaten (Hypercenter XP, Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland) im histopathologischen Routineablauf entwässert und jeweils Quer- und Längsschnitte der Gefäße in Paraffin eingebettet. Es wurden 1µm dicke Schnitte von den Paraffinblöcken mit einem Microtom (LAICA RM 2035, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, geputzt/ gebrauchsfertig, Braunschweig, Deutschland) gebracht und für eine Stunde in einem Wärmeschrank bei +70°C (Heraeus instruments-function line, Hanau, Deutschland) zur Vorbereitung der histochemischen Färbungen inkubiert. Dann erfolgten die histochemischen Routinefärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE), Elastica-van Gieson (EvG) und Alcianblau nach standardisierten Protokollen [Boenisch 2003].

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte nach dem Aufbringen auf spezielle Objektträger (Super Frost Plus Objektträger, geputzt/ gebrauchsfähig/ geschliffen, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) auch in einen Wärmeschrank, jedoch bei einer Temperatur von +58°C für 12 Stunden verbracht. Es wurden für die Immunhistologie Antikörper gegen S-100 (mouse, clone 15E2E2, BioGenex, San Ramon, CA, USA, Verdünnung 1:5.000), CD34 (mouse, clone QBEnd 10, Dako, Glostrup, Denmark, Verdünnung 1:50), HLA Klasse I (mouse, clone EMR8-5, Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan, Verdünnung 1:100), HLA Klasse II (mouse, clone CR3/43, Dako, Verdünnung 1:100) und glattmuskuläres Aktin (mouse, clone 1A4, Dako, Verdünnung 1:100) verwendet. Als Detektionssystem wurde ein handelsübliches gebrauchsfertiges LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin) Kit (Dako) entsprechend des Herstellerprotokolls genutzt.

Zur Kontrolle der jeweiligen Austestung der immunhistologischen Färbungen wurde ein Gewebeschnitt mit einem sogenannten Nonsense-Antikörper als Negativkontrolle (IgG2a negative control, clone GC270, Chemicon Australia, 34 Wadhurst Drive Boronia Victoria, Australia) in jeder Färbereihe mitgeführt.

Zur Austestung der jeweiligen Antikörper waren mehrere Färbereien mit unterschiedlichen Konzentrationen und Detektions-Kits notwendig, bevor die oben genannten Verdünnungen und Reagenzien festgelegt werden konnten. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Präparate mikroskopisch ausgewertet. Hierbei wurden zuerst die T1 Proben in der HE-Färbung untersucht und kritisch mit den T0 Proben verglichen.

Es wurde auf mögliche Veränderungen wie

- 1) Longitudinale oder die gesamte Zirkumferenz betreffende Rupturen oder Risse,
- 2) Auffälligkeiten der Kerne und
- 3) Zelluläre Abweichungen, wie zum Beispiel Ballonierung des Zytoplasmas oder Ruptur der Zellmembran geachtet.

Alle Auffälligkeiten wurden zunächst beschreibend notiert.

Bei den wenigen Fällen einer Explantation eines allogenen Gefäßersatzes (T2) wurde in der ersten Begutachtung der HE-Färbung vor allem nach pathologischen Veränderungen wie Thrombosen, Nekrosen und Entzündungsreaktionen im Vergleich zu den T0- und T1-Proben gesucht.

Die arteriosklerotischen Veränderungen wurden mit Hilfe einer modifizierten Klassifikation der American Heart Association [Virmani 2000] beschrieben. Diese beinhaltet 8 verschiedene Läsionstypen, welche von Beschädigungen der Intima bis zu komplexen arteriosklerotischen Veränderungen wie rupturierte Plaques reichen. Wurden in einer Probe mehrere verschiedene arteriosklerotische Läsionen gefunden, so wurde die jeweils höchstgradige Läsion dokumentiert. Für die Erfassung der Arteriosklerose dienten vor allem die HE- und die EvG-Färbung. Nach der ersten Bewertung wurde das Endothel in der CD-34-Färbung (Verdünnung 1:50) untersucht, hierbei wurden die CD-34 positiven Areale, welche die Intaktheit des Endothels demonstrierten, in 10-Prozent-Schritten angegeben. Weiterhin wurde mit Hilfe der EvG-Färbung eine eventuelle Degeneration der Gefäßmedia anhand der Integrität der elastischen Fasern erfasst. Die Einteilung erfolgte semiquantitativ mittels eines Scores von 0 (vollkommen intakte elastische Fasern) bis 3 (völlig aufgehobene Struktur). In gleicher Weise wurde die Struktur der Muskelfasern mittels Antikörper gegen glattmuskuläres Aktin in der Immunhistologie erfasst (0=normale Struktur; 3=stark fragmentiert, kaum bis keine Muskelfasern).

Um vorhandene degenerative Veränderungen noch genauer zu erfassen, wurde die Alcianblau-Färbung herangezogen. Hierbei wurden die Muzinablagerungen, die ein Zeichen für degenerative Veränderungen sind, beurteilt. Hierfür führten wir wiederum einen Score von 0 (normale Menge Alcian-positiver Interzellulärsubstanz) bis 3 (starke Muzinablagerungen, starke degenerative Veränderungen) ein.

Zusätzlich wurde der Versuch gemacht, über die immunhistologische Darstellung der kleinen Nervenfasern (S-100 positiv) in der Gefäßwand eine Information über die Struktur und Viabilität/ Vitalität zu erhalten.

Zum Abschluss wurden noch die Anzahl der HLA Klasse I- und HLA Klasse II- positiven Zellen beurteilt, wobei ein Score von 0 (keine positiven Zellen) bis 2 (normale Anzahl) eingesetzt wurde, um eine eventuelle Aussage über immunologische Prozesse treffen zu können.

2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet sowie Minima, Maxima und Medianwerte ermittelt. Für die Korrelation der histopathologischen beziehungsweise immunhistologischen Merkmale mit den klinischen Ergebnissen wurde Pearson's Korrelationskoeffizient berechnet. Die Höhe der Irrtumswahrscheinlichkeit p der Unterschiede zwischen der T0- und T1-Gruppe wurde mit Hilfe des Student's T-Test für metrische Variablen und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests für ordinale Variablen berechnet. Eine Signifikanz wurde angenommen, wenn $p < 0.05$ war.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Falldaten

Während der Nachbeobachtung, welche bis Mai 2008 durchgeführt wurde, starben 15 Patienten an den Folgen jener Erkrankung, die ursächlich zur Allograftimplantation geführt hatte. 3 weitere Patienten starben ohne ursächliche Beziehung zur Allograftimplantation beziehungsweise ihrer Grunderkrankung. 4 Patienten waren nicht mehr auffindbar zu machen. 18 Patienten lebten zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung. 4 von diesen Patienten hatten sich in der Zwischenzeit einer Revisionsoperation unterziehen müssen. 6 Patienten hatten Komplikationen, welche einer nicht chirurgischen Behandlung bedurfte und 8 Patienten hatten keine postoperativen Komplikationen.

Die Zeit bis zum Eintreten einer Komplikation, einer Revisionsoperation oder des Todes (progressfreies Überleben) betrug 2 bis 2.168 Tage. Daraus ergibt sich ein arithmetisches Mittel von 475 Tagen (Standardabweichung 651). Die gesamte Überlebenszeit betrug 3 bis 2.168 Tage, woraus sich eine mittlere Überlebenszeit von 576 Tagen (Standardabweichung 706) ergab. Es gab verschiedene Gründe für Revisionsoperationen. Hierunter fielen Blutungen, Infektionen und Verschlüsse der allogenen Gefäßersatz. Eine Gesamtanzahl von 6 Revisionsoperationen wurde bei insgesamt 4 Patienten durchgeführt. 2 von diesen Eingriffen waren Extremitätenamputationen. Klinische Komplikationen ohne chirurgische Intervention, wie das Auftreten von nicht hämodynamisch relevanten Stenosen der arteriellen Allografts, konnten bei 6 Patienten diagnostiziert werden.

Tabelle 3 fasst die aufgetretenen Komplikationen der verschiedenen Fälle beziehungsweise den Eintritt des Todes in Bezug zur Allograftimplantation zusammen und zeigt das progressfreie Überleben in Tagen auf.

Tabelle 3: Aufstellung der untersuchten Fälle in Bezug auf eventuelle Komplikationen/ Revisionseingriffe/ Tod und des progressfreien Intervalls

Fall	Operationsindikation	Komplikation/ Tod	Revision	Allograft-bezogen	Progressfreies Überleben
1	Aortointestinale Fistel	Aneurysma spurium	ja	ja	etwa 300 d
2	V. portae-Hypoplasie	verstorben	-	nein	etwa 120 d
3	Pankreastumor	-	-	nein	-
4	Leberarterienstenose	-	-	nein	-
5	Aortoduodenale Fistel	verstorben	-	nein	19 d
6	pAVK	Aneurysma vera	ja	ja	etwa 1230 d
7	Leberarterienstenose	-	-	nein	etwa 1680 d
8	Pankreastumor	-	-	nein	-
9	Aneurysma spurium	-	-	nein	-
10	Pankreastumor	-	-	nein	-
11	pAVK	-	-	nein	-
12	Aneurysma spurium	Infektion	ja	ja	29 d
13	Infektion	Infektion	ja	ja	49 d
14	Infektion	verstorben	-	unbekannt	3 d
15	Infektion	Infektion	ja	ja	etwa 200 d
16	Pankreastumor	Blutung	nein	wahrsch.	19 d
17	Pankreastumor	-	-	nein	-
18	Infektion Prothese	-	-	nein	-
19	Infektion Prothese	Beckenarterienstenose	ja	ja	etwa 450 d
20	Infektion/ Blutung	-	-	nein	-
21	Pankreastumor	Anastomoseninsuffizienz	-	nein	41 d
22	Beckenarterienstenose	-	ja	nein	-
23	inf. Aneurysma spurium	-	-	nein	-
24	Infektion Bypass	Lymphfistel	ja	ja	13 d
25	Inf./ Blutung Bypass	-	-	nein	-
26	Leberarterienstenose	verstorben (LTx-Versagen)	-	unwahr.	etwa 1110 d
27	mykotisches Aneurysma	LTx-Versagen	ja ¹	ja	10 d
28	Pankreastumor	verstorben	-	nein	69 d
29	Chondrosarkom	verstorben	-	unwahr.	235 d
30	Truncus coeliacus-Verschluss	Aneurysm spurium/ Blutung/ verstorben	ja	ja	27 d/ 48 d
31	traumat. Aortenverletzung	Arrosionsblutung	nein ²	ja	12 d

¹ erneute Meldung zur Lebertransplantation bei frustanem Organerhalt durch Rekonstruktion der A. hepatica mittels Gefäßallograft

² Arrosionsblutung im Bereich distal des aortalen Allografts, hämorrhagischer Schock mit konsekutiven Herz-Kreislaufstillstand

32	Aortoduodenale Fistel	Allograftverschluss	nein ³	ja	3 d
33	Infektion Prothese	Pseudoaneurysma	ja	ja	142 d
34	Infektion Prothese	Bypassverschluss	ja	ja	2 d
35	Infektion Prothese	-	-	nein	-
36	Aneurysma spurium	verstorben	-	unwahr.	34 d
37	Infektion Bypass	Blutung/ Verschluss	ja	ja	82 d/ 201 d
38	Infektion Bypass	Wundheilungsstörung	ja	wahrsch.	44 d
39	Infektion Bypass	Lymphfistel	ja	ja	13 d
40	Aortoduodenale Fistel bei inf. Rohrprothese	verstorben	-	nein	57 d
41	Infektion Bypass	Allograftstenose	nein ⁴	ja	etwa 840 d
42	Infektion Bypass	-	-	nein	-
43	Infektion Bypass	-	-	nein	-
44	Infektion Bypass	-	-	nein	-
45	aortoduodenale Fistel	Allograftteilnekrose	nein ⁵	ja	12 d
46	Infektion Bypass	Allograftverschluss	ja	ja	2 d

In den Fällen 11, 12, 13, 15 und 22 handelt es sich um denselben Patienten, der wie oben aufgezeigt, sich mehreren Revisionsoperationen unterziehen musste. Der Patient war ein älterer, multimorbider Patient mit pAVK Stadium IIb, bei dem ein Verschluss des femoro-antertibialen in-situ-Venenbypasses rechts diagnostiziert wurde. Es erfolgte die Anlage eines popliteo-cruralen Bypasses mittels arteriellem Allograft (bei schon zuvor verwendeten kleinkalibrigen autologen Venen). Im Verlauf entwickelte sich jedoch ein Aneurysma spurium, welches reseziert werden musste. Des Weiteren wurden mehrfach Bypassinfektionen auf Grund seines Alters und seiner Multimorbidität mit immunkompromittiertem Allgemeinzustand nach mehrfachen Revisionseingriffen diagnostiziert und zum Teil chirurgisch, aber auch konservativ antimikrobiell therapiert. Letztendlich wurden bei einer elektiven Wiederaufnahme in der durchgeführten Angiographie des rechten Beines mehrere Teilverschlüsse der Arteria femoralis superior sowie der Unterschenkelarterien nachgewiesen. Es erfolgte die chirurgische Thrombektomie.

In wenigen Fällen wurden schon intraoperativ beziehungsweise perioperativ kritische Durchblutungen mit Ischämiezeichen der unteren Extremität manifest.

³ Klinische Sektion: Septikopyämie und thrombotischer Verschluss des Homografts

⁴ keine chirurgische Sanierung notwendig

⁵ aortale Blutung bei Teilnekrose des Allografts, hämorrhagischer Schock mit konsekutivem Herz-Kreislaufstillstand

Im Fall 5 wurde die Patientin postoperativ auf die Intensivstation verbracht. Hier zeigte sich dann das Bild eines SIRS beziehungsweise einer Sepsis mit Multiorganversagen und NSTEMI. Die Patientin verstarb 19 Tage nach der Operation.

Eine klinische Sektion wurde bei dem Patienten im Fall 32 durchgeführt. Der pathologische Befund zeigte eine Septikopyämie und einen thrombotischen Verschluss des arteriellen Allografts. Der Patient verstarb 3 Tage postoperativ.

In zwei anderen Fällen (Fall 19 und Fall 37) zeigten sich erst nach einigen Monaten (15 Monate beziehungsweise fast 7 Monate) Ischämiezeichen, die in diesen Fällen zu einer Oberschenkelamputation führten. Ob die Patienten zu spät selektiert wurden und daher eine Thrombektomie nicht mehr möglich war, bleibt fraglich.

Es zeigten sich auch einige Blutungen nach arteriellem Allograftersatz wie bei dem Patienten im Fall 45, bei dem es zu einer akuten Blutung kam, aus der sich ein hämorrhagischer Schock mit konsekutivem Herz-Kreislaufstillstand 12 Tage postoperativ entwickelte. Die pathologisch-anatomische Untersuchung ergab eine Teilnekrose des arteriellen Allografts.

Auch im Fall 16 verstarb der Patient innerhalb von wenigen Tagen an der Folge einer intraabdominellen Blutung unklarer Ursache im hypovolämischen Herz-Kreislaufstillstand.

Im Fall 37 konnte die arterielle Blutung nach einem P1-Allograft-Bypass bei Wundinfektion durch Übernähung der Arteria femoralis gestillt werden.

Weiterhin wurden die arteriellen Gefäßersätze auch zur Rekonstruktion von Leberarterien nach Lebertransplantation eingesetzt. Hierbei zeigten sich zum einen sehr gute Ergebnisse der Perfusion in den routinemäßig durchgeführten Kontrolluntersuchungen nach 16 Monaten, aber zum anderen führte auch der Ersatz der Arteria hepatica im Fall 27 zu einem frustrierten Organerhalt mit Neumeldung zur Lebertransplantation nach wenigen Tagen.

Andere Komplikationen, die in der Gefäßchirurgie auftreten können, wurden auch in diesem Patientenkollektiv gefunden, wie zum Beispiel Lymphfisteln und wie o.g. auch Infektionen, Aneurysmen und Wundheilungsstörungen.

Nichtsdestotrotz verstarben einige Patienten auch in der Folge ihrer multiplen Nebenerkrankungen (z. B. Fall 28).

3.2. Durch Kryokonservierung hervorgerufene Schädigungen

Bei der orientierenden Beurteilung der Gewebe in der HE-Färbung wurden sowohl in der T0- als auch in der T1-Gruppe kurzstreckige bis semizirkulär verlaufende Gewebstrennungen beziehungsweise Inkontinuitäten beobachtet.

In den meisten dieser Fälle wurden diese Veränderungen zwischen der Intima und der *Elastica interna* gefunden. Da diese Veränderungen die gleiche Morphologie wie künstlich durch Formalinfixierung, Paraffin-Einbettung und Schneiden der fixierten Gewebe hervorgerufene Schädigungen aufwiesen, und diese Veränderungen sowohl in der T0 als auch in der T1 Gruppe zu finden waren, wurden diese als Artefakte eingestuft. Solche Veränderungen durch mechanische Beanspruchung während der Aufbereitung der Gewebe wurden bereits früh in der Literatur genannt [Hunt 1994].

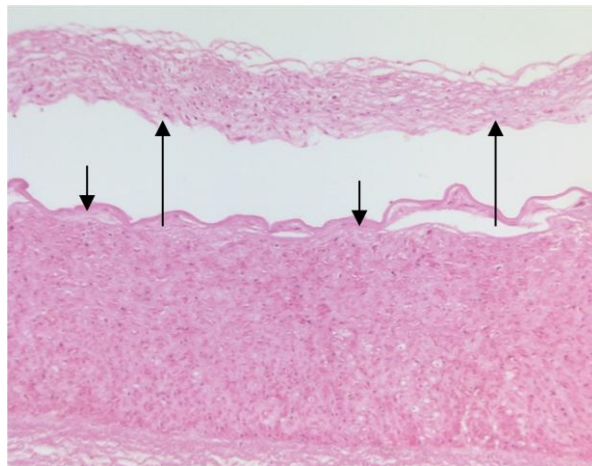


Abbildung 6: Beispiel für künstlich hervorgerufene Schädigungen bzw. Risse zwischen Intima (lange Pfeile) und Media (kurze Pfeile), vor Kryokonservierung. HE, 50fache Vergrößerung

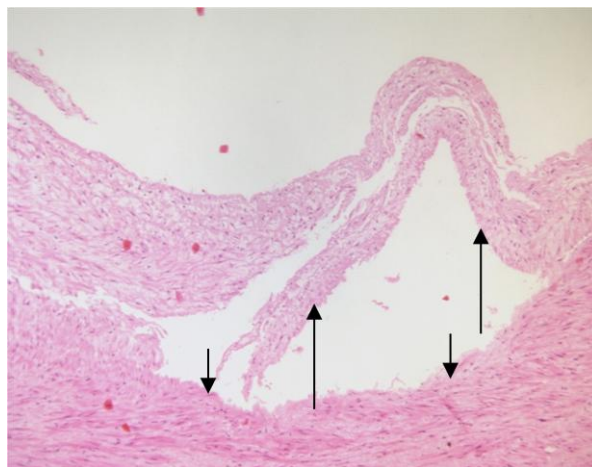


Abbildung 7: Risse zwischen Intima (lange Pfeile) und Media (kurze Pfeile), nach Kryokonservierung. HE, 50fache Vergrößerung

Während der ersten einschätzenden mikroskopischen Beurteilung wurden Veränderungen der glattmuskulären Zellen der Media in der kryokonservierten T1-Gruppe entdeckt, die als ballonierete Vakuolisierung des Zytoplasmas beschrieben werden können. Diese Veränderungen traten jeweils in kleinen Zellgruppen sowohl in der inneren als auch in der äußeren Schicht der Media auf. Nachdem dieses Phänomen mit recht konstanter, übereinstimmender Morphologie in verschiedenen Proben identifiziert und überzeugend vom umliegenden Normalgewebe abgegrenzt werden konnte, wurden diese Areale in einer nochmaligen systematischen Untersuchung sowohl in der T0- als auch in der T1-Gruppe mittels der HE-Färbung in 10%-Schritten quantitativ dokumentiert.

In der T0 Gruppe wurden diese Veränderung in 3 Proben gefunden, wobei die maximale Ausprägung bei 30% lag. Hierbei ergab sich ein Median von 0% und das arithmetische Mittel lag bei 3%.

In der T1 Gruppe wurde diese Läsion bereits in 21 Proben gefunden. Die prozentuale Verteilung lag zwischen 0 % und 50%. Der Median lag bei 10% und das arithmetische Mittel betrug 14%. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war somit signifikant ($p=0.021$).

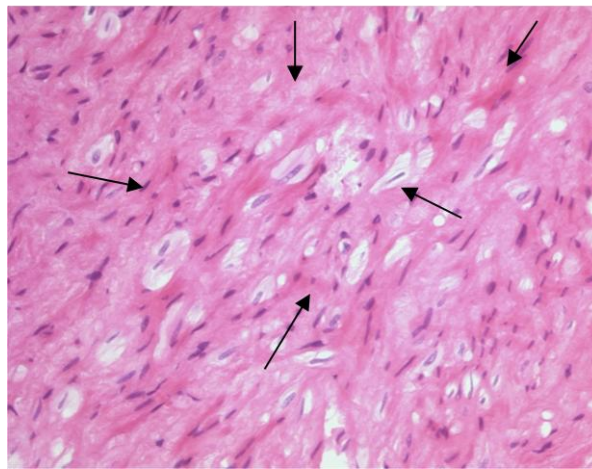


Abbildung 8: Aufgetriebenes Zytoplasma der glattmuskulären Zellen der Media (Pfeile), vor Kryokonservierung. HE, 200fache Vergrößerung

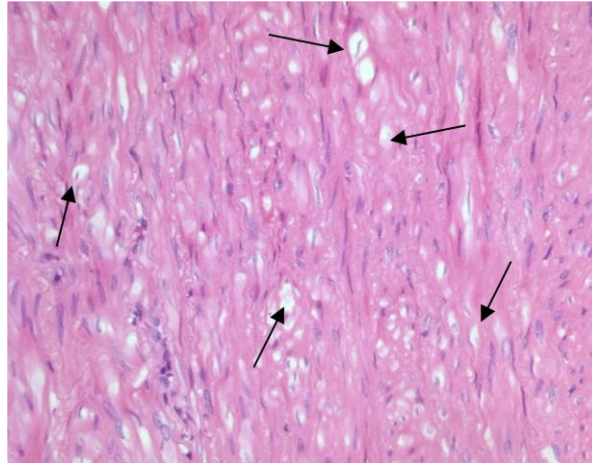


Abbildung 9: Aufgetriebenes Zytoplasma der glattmuskulären Zellen der Media (Pfeile), nach Kryokonservierung. HE, 200fache Vergrößerung

Es gab aber keine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung dieses histopathologischen Merkmals und des jeweiligen postoperativen Verlaufs ($r=0.050$, $p=0.806$).

3.3. Schädigung des Endothels

Für die orientierende Einschätzung der Schädigung beziehungsweise des Verlustes des Endothels wurde zunächst wieder die HE-Färbung herangezogen, jedoch war mit dieser eine differenzierte Beurteilung nicht möglich. Daher kam die CD34-Immunhistologie zum Einsatz. Hierbei wurde die Intaktheit des Endothels in Prozent angegeben, wobei eine Differenzierung in 10% Schritten erfolgte.

In der T0-Gruppe wurden sowohl Verluste des Endothels (0%) als auch gut erhaltenes Endothel (90%) gefunden. Daraus ergaben sich ein Mittelwert von 59% und eine Standardabweichung von 25. In der T1-Gruppe hingegen wurde die Intaktheit des Endothels zwischen 0% und 50% beobachtet (Mittelwert 18%, Standardabweichung 15). Trotz dieses sichtbaren Unterschiedes war die Reduktion des Endothels nach der Kryokonservierung nicht signifikant ($p=0.187$).

Die Korrelation ($r=0.148$) zwischen dem Verlust beziehungsweise der Reduktion des Endothels und dem Auftreten von postoperativen Komplikationen oder gar des Todes waren auch bei diesem Untersuchungsmerkmal nicht signifikant ($p=0.451$).

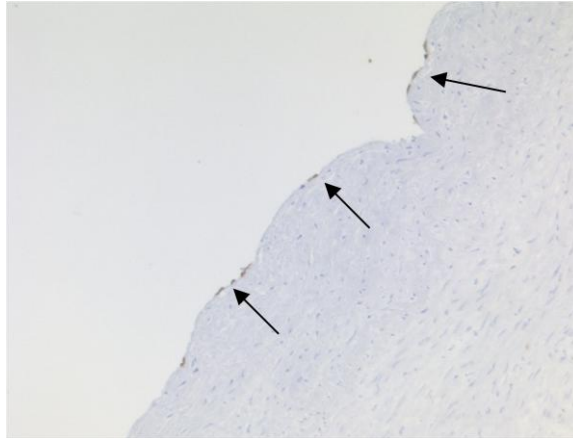


Abbildung 10: Beispiel für verbliebene Endothelzellen (Pfeile, braune immunhistologische Reaktion), nach Kryokonservierung. CD 34 Immunhistologie, 100fache Vergrößerung

3.4. Degeneration der Media

Um eine eventuelle Degeneration der Media zu beurteilen, wurden zum einen die elastischen Fasern in der EvG-Färbung (schwarz angefärbte, leicht gewellt verlaufende Fasern) und zum anderen die Muskelfasern anhand der Immunhistologie für glattmuskuläres Aktin begutachtet. Des Weiteren wurden Muzinablagerungen, die auch mit einem degenerativen Prozess der Media vergesellschaftet sind, in der Alcian-Färbung erfasst.

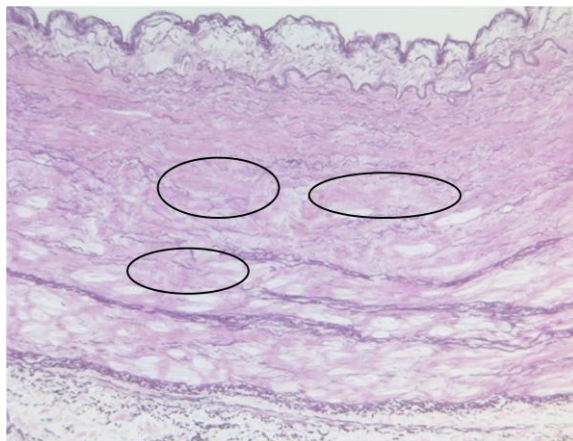


Abbildung 11: Erheblicher Verlust der elastischen Fasern (Ovale), nach Kryokonservierung. EvG, 100fache Vergrößerung

Vor allem die Degeneration der elastischen Fasern und die Anhäufung von Muzinablagerungen waren in der T1-Gruppe im Vergleich zu der T0-Gruppe signifikant ($p=0.004$ und $p=0.026$). Jedoch konnte dies nicht bei den Muskelfaserzellen beobachtet werden ($p=0.063$). Diese drei histomorphologischen Merkmale ($r=-0.297$, $r=-0.354$ und $r=-0.418$) wurden mit dem klinischen Verlauf korreliert, wobei keine dieser Korrelationen eine Signifikanz zeigen konnte ($p=0.125$, $p=0.351$ und $p=0.137$).

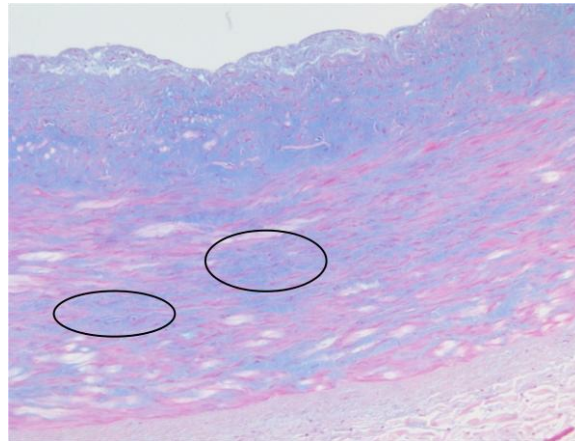


Abbildung 12: Muzinablagerungen (Ovale), nach Kryokonservierung. Alcian, 100fache Vergrößerung

Tabelle 4: Semiquantitative Evaluation (von 0=normal bis 3=pathologisch) der Diskontinuität der elastischen Fasern, der Degeneration der glattmuskulären Zellen und der Muzinablagerungen als Merkmal für die Degeneration der Media. Mittelwert, arithmetisches Mittel, Standardabweichung, T0=Proben vor Kryokonservierung, T1=Proben nach Kryokonservierung und Auftauprozess, Signifikanz $p<0.05$

	Minimum	Maximum	Median	STD	Unterschiede T0 versus T1
Risse der elastischen Fasern in T0	0	1.5	0.9	0.5	$p = 0.004^*$
Risse der elastischen Fasern in T1	0	2.5	1.4	0.5	
Degeneration glattmuskulärer Z. in T0	0	1.0	0.8	0.4	$p = 0.063$
Degeneration glattmuskulärer Z. in T1	0.5	1.5	1.0	0.2	
Muzinablagerungen in T0	0	1.0	0.9	0.3	$p = 0.026^*$
Muzinablagerungen in T1	1	2.5	1.5	0.5	

3.5. Immunhistochemische Merkmale

Das Vorhandensein von nervalen Strukturen in den Proben konnte anhand der S-100 positiven Reaktionen bewiesen werden, die sich sowohl in der T0- als auch in der T1-Gruppe zeigten und keine überzeugenden morphologischen Schäden aufwiesen. HLA Klasse I-immunreaktive Zellen konnten in beiden Gruppen nachgewiesen werden.

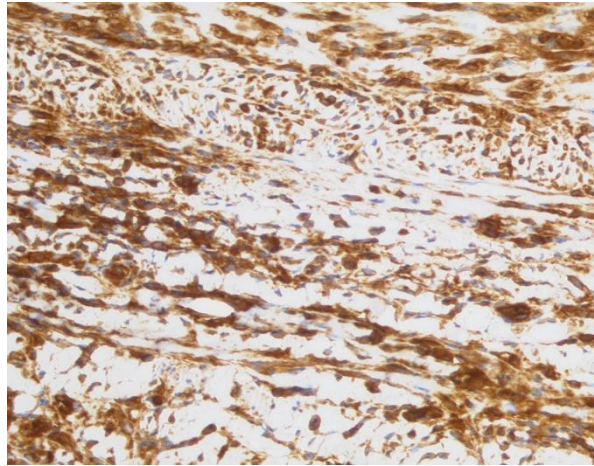


Abbildung 13: Immunreaktive Zellen (braune Anfärbung), nach Kryokonservierung. HLA Klasse I Immunhistologie, 200fache Vergrößerung

Anders verhielt es sich mit den HLA Klasse II-immunreaktiven Zellen, die in verschiedener Ausprägung in den einzelnen Proben zu finden waren. In der T0-Gruppe konnten in 46% der Fälle keine HLA Klasse II-positive Zellen nachgewiesen werden. Einige HLA Klasse II-immunreaktive Zellen konnten bei 54% der Proben gefunden werden.

In der T1-Gruppe wurden in 73% der Fälle keine HLA Klasse II-immunreaktiven Zellen und nur in 18% der Fälle konnten einige wenige dieser Zellen nachgewiesen werden.

Aber im Gegensatz dazu wurden in lediglich 9% der Proben viele HLA Klasse II-immunreaktive Zellen gefunden.

Letztendlich korrelierten diese Ergebnisse nicht mit dem klinischen Verlauf der Fälle ($r=0.088$, $p=0.821$).

3.6. Rejektion

In 6 Fällen wurden die arteriellen Allografts auf Grund von Funktionsverlust beziehungsweise Transplantatversagen explantiert. In jeder dieser Proben zeigten sich nekrotische Areale der Intima, Media und Adventitia auf bis zu 50% der Schnittfläche. Weiterhin konnten entzündliche Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Übersicht der Merkmale von Empfänger und Spender, Implantationsindikationen, Komplikationen und histologische Merkmale der 6 explantierten Allografts. m=männlich, w=weiblich, n=nicht evaluierbar, ng=neutrophile Granulozyten, lc=Lymphozyten, mp=Makrophagen

Empfänger Alter, Geschlecht	Spender Alter, Geschlecht	Auf- bewahrung (in Tagen)	Homograft in situ (in Tagen)	Indikation	Komplikation	Histol. Merkmale
64, m	26, m	132	1262	Arteriosklerose der A. femoralis	Aneurysma	Fokale Nekrose, geringe Infiltrate (ng+lc), Thrombose
63, m	n	n	49	Arteriosklerose der A. iliaca	Infektion	Ausgeprägte Nekrose, geringe Fibrose, moderate Infiltrate(ng)
52, m	48, m	39	10	Leberzirrhose	Putride Cholangitis	Moderate Nekrose, moderate Infiltrate (ng),Thrombose
44, f	59, n	37	48	Occlusion des Truncus coeliacus	Insuffiziente Anastomose	Moderate Nekrose, geringe Infiltrate(ng, mp)
52, f	16, f	334	305	Arteriosklerose der A. iliaca	Aneurysma	ausgeprägte Nekrose, perivaskuläre Fibrose, geringe Infiltrate (lc)
62, m	n	n	12	Infizierte synthetische Aorten- prothese	Blutung	ausgeprägte Nekrose, dichte Infiltrate (ng), Bakterien

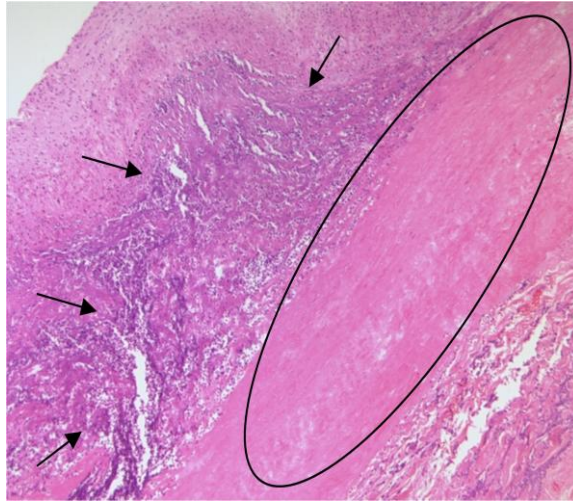


Abbildung 14: Darstellung nekrotischer Areale (Oval) und dichter, abszessähnlicher akuter Inflammation (kurze Pfeile), nach Explantation. H.E., 50fache Vergrößerung

Außerdem konnten chronische Entzündungen, die zur Bildung von Granulationsgewebe mit Fibroblasten und Riesenzellen einschließlich chirurgischer Fäden, nachgewiesen werden.

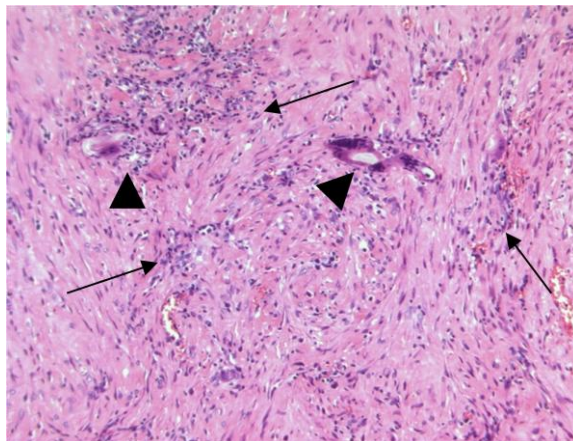


Abbildung 15: Darstellung chronischer Inflammation (lange Pfeile) und chirurgischer Materialien (Pfeilspitzen), nach Explantation. H.E., 50fache Vergrößerung

In einer Probe nach Explantation konnten histomorphologische Merkmale wie Verdickung der Intima, Degeneration der Media und zelluläre Infiltrate in der Adventitia nachgewiesen werden, wie sie auch bei einer chronischen Rejektion nach Organtransplantation von Montomura und Mitarbeitern beschrieben wurden [Montomura 1995]. Auch Ruotolo und seine Arbeitsgruppe beschrieben typische Zeichen einer chronischen Abstoßung. Dies waren Proliferation der Intima, Nekrosen der glattmuskulären Zellen der Media und dichte Entzündungsinfiltrate [Ruotolo 1997].

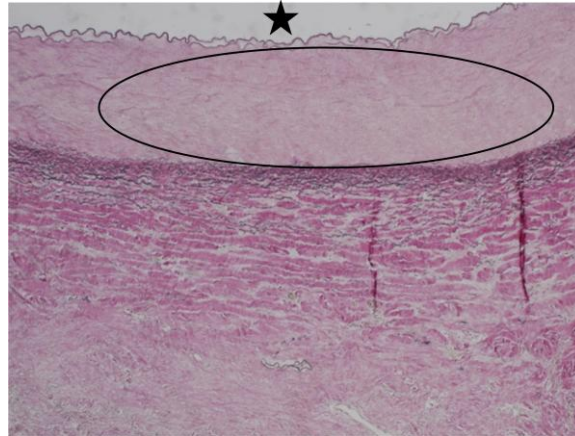


Abbildung 16: Kompletter Verlust der Intima (Stern), azelluläre Media ohne elastische Fasern, nach Explantation. HE, 50fache Vergrößerung

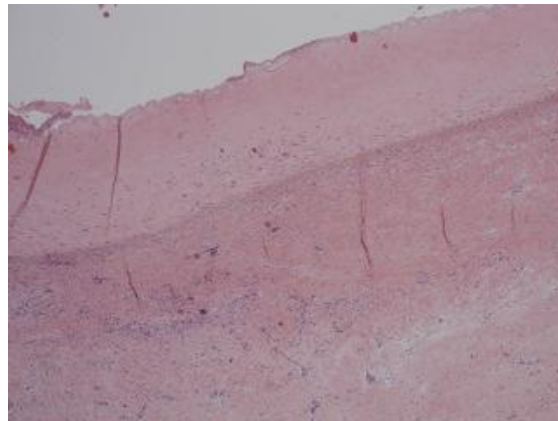


Abbildung 17: Fibrotische Adventitia mit Lymphozyten-Aggregaten, nach Kryokonservierung. HE, 50fache Vergrößerung

Die mikrobiologischen Befunde der T0- und T1-Proben ergaben Nachweise von vereinzelt bis mäßig vielen koagulasenegativen Staphylokokken (n=2), grampositiven Kokken (zum Zeitpunkt der Mikroskopie und Kultivierung noch nicht weiter spezifiziert) (n=2), *P. aeruginosa* (n=2), *E. faecalis* (n=1), *S. aureus* (n=1), gramnegativen Stäbchen sowie *S. mitis*.

Aber es wurden auch vereinzelt Nachweise von *C. albicans* gefunden.

Dieses Spektrum könnte vor allem durch Kontaminationen bei der Entnahme und Konservierung der Gewebe verursacht worden sein, ferner als eine zum Zeitpunkt des Todes des Spenders bestehende Infektion gewertet werden.

In nur einem Fall (Fall 11) gab es sowohl vor als auch nach Kryokonservierung eine Besiedlung mit Keimen, in diesem gesonderten Fall mit Enterokokken species. In nur 3 von uns untersuchten Fällen konnte eine mikrobielle Doppelbesiedlung von Bakterien und Sproßpilzen detektiert werden.

Tabelle 6 fasst die wichtigsten mikrobiologischen Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen.

Tabelle 6: Mikrobielle Besiedlung verschiedener Proben vor und nach Kryokonservierung

Fall	Erregerspektrum T0	Erregerspektrum T1
4	geringes Wachstum Hautflora	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
8	kein mikrobiologischer Befund vorliegend	Sprosspilze, anhämolysierende Streptokokken
9	kein Wachstum	Koagulasenegative Staphylokokken
11	reichlich Enterokokken, mäßig Staphylokokken	mäßig <i>Enterococcus species</i>
14	anaerobe grampositive Kokken	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
18	<i>E. faecalis</i>	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
23	kein Wachstum	reichlich <i>S. aureus</i>
27	kein Wachstum	vereinzelt <i>P. aeruginosa</i>
28/30	vereinzelt <i>P. aeruginosa</i>	Kein mikrobiologischer Befund vorliegend
33	Kein Wachstum	vereinzelt Sprosspilze
42	vereinzelt <i>S. mitis</i>	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
44	<i>E. faecalis</i>	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
45 I	vergrünende Streptokokken	kein mikrobiologischer Befund vorliegend
45 II	Koagulasenegative Staphylokokken	kein mikrobiologischer Befund vorliegend

3.7. Arteriosklerose

Erstaunlicherweise konnten in vielen Proben arteriosklerotische Veränderungen detektiert werden, so dass auch eine Einteilung dieser Pathologie in der vorliegenden Arbeit erfolgte. Außerdem wurden die verschiedenen arteriosklerotischen Auffälligkeiten in Bezug zum klinischen Ergebnis gesetzt.

Die Einteilung der Arteriosklerose erfolgte anhand der modifizierten Klassifikation der American Heart Association nach Virmani et al [Virmani 2000]. Diese Einteilung umfasst 8 verschiedene Typen von Läsionen. Beginnend mit Veränderungen der Intima, die von nicht arteriosklerotisch bedingten minimalen Läsionen der Intima über Verdickung der Intima (sog. intimal thickening) bis zum Xanthom der Intima (intimal xanthoma oder fatty streaks) reichen. Nach diesen leichten beziehungsweise geringgradigen Veränderungen folgen dann progressive und komplexe arteriosklerotische Läsionen, die von der pathologischen Verdickung der Intima (pathological intimal thickening) bis zur Ruptur eines Plaques (plaque rupture) reichen. Hierunter zählen auch Erosionen und nekrotische Areale mit einem fibrösen Überzug (fibrous

cap atheroma und thin fibrous cap atheroma). Auch kalzifizierte Knötchen (calcified nodule) mit darunter liegendem kollagenreichem Plaque (fibrocalcific plaque) sind den komplexen Läsionen zugeordnet.

Die Verteilung der arteriosklerotischen Veränderungen kann der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Anzahl (in Prozent) der arteriosklerotischen Veränderungen in den T0- und T1- Proben anhand histopathologischer Kriterien nach Virmani et al. 2000

	Anzahl in T0 Proben	Anzahl in T1 Proben
keine Arteriosklerose	2 (10%)	3 (9%)
Verdickung der Intima	4 (19%)	7 (21%)
Xanthom der Intima	7 (33%)	10 (30%)
Pathologische Intimaverdickung	4 (19%)	3 (9%)
Atherom mit fibröser Kappe	1 (5%)	1 (3%)
Fibröse, kalzifizierte Plaque	3 (14%)	7 (21%)
Verschluss oder Ruptur	0 (0%)	1 (3%)
Gesamt	21 (100%)	33 (100%)

Veränderungen der Intima wie intimal thickening oder intimal xanthoma konnten bei 60% der Proben nachgewiesen werden, während komplexe Läsionen in etwa 40% der Proben beobachtet wurden. Von den Patienten, die arterielle Allografts ohne arteriosklerotische Veränderungen oder mit geringen Läsionen (intimal thickening oder intimal xanthoma), welche in der T1-Gruppe identifiziert wurden, erhalten haben, hatten 8 Patienten keine postoperativen Komplikationen, 5 von ihnen entwickelten Komplikationen und 5 von ihnen starben.

Im Vergleich dazu traten bei den Patienten, die arterielle Allografts mit höhergradigen Läsionen (pathological intima thickening, thin fibrous cap atheroma, fibrocalcific plaque, occlusion oder rupture) erhielten, bei nur 2 Patienten von ihnen keine postoperativen Komplikationen auf, während sich bei 3 Patienten Komplikationen entwickelten und 6 Patienten starben.

Trotz dieser Ergebnisse konnte kein signifikanter Einfluss der arteriosklerotischen Läsionen zum klinischen Verlauf hergestellt werden ($p=0.265$).

Tabelle 8 zeigt die arteriosklerotischen Veränderungen in Abhängigkeit des Alters des Spenders auf, wobei die zu erwarteten komplexeren arteriosklerotischen Ausprägungen bei den älteren Spendern zu finden waren.

Tabelle 8: Korrelation des Spenderalters und den ausgeprägtesten arteriosklerotischen Veränderungen

Alter des Spenders (in Jahren)	Arteriosklerose
8	Intimal xanthoma
19	Intimal thickening
26	Intimal xanthoma
35	Intimal thickening
36	Pathologic intimal thickening
39	Intimal xanthoma
39	Intimal xanthoma
40	Intimal xanthoma
41	Intimal xanthoma
42	Fibrocalcific plaque
43	Pathologic intimal thickening
44	Intimal xanthoma
47	Fibrous cap atheroma
49	Intimal xanthoma
52	Fibrocalcific plaque
52	Intimal thickening
56	Intimal xanthoma
59	Thin fibrous cap atheroma
59	Fibrocalcific plaque
61	Fibrocalcific plaque
64	Fibrocalcific plaque
66	Fibrocalcific plaque

4. Diskussion

Diese Arbeit untersuchte und verglich systematisch die histopathologische Morphologie von arteriellen allogenen Gefäßersätzen von hirntoten Organspendern vor und nach Kryokonservierung und in 6 Fällen nach Explantation des Gefäßtransplantates aus dem Empfänger.

Die verwendeten allogenen Gefäßersätze kamen vor allem in der Gefäßrekonstruktion bei der Tumorchirurgie (Pankreas, Leber) sowie als Therapieversuch zur Ausschaltung von Aneurysmen zum Einsatz. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet war der Ersatz von infizierten Gefäßprothesen, vor allem bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. In einigen Fällen wurden die Allografts auch zur Ausschaltung von aortointestinale Fisteln verwendet. In dieser Studie wurde in jeweils nur einem Fall der arterielle Gefäßersatz bei einem Chondrosarkom und im Notfall bei einer Aortenverletzung nach Polytrauma verwendet.

4.1. Schäden durch Kryokonservierung

Gegenstand dieser Arbeit war die Identifizierung von möglichen Schäden, die durch die Kryokonservierung von allogenen Gefäßersätzen entstanden sein konnten. Hierzu wurden die verschiedenen Proben vor und nach Kryokonservierung beurteilt. Jedoch konnten keine beziehungsweise nicht signifikante durch die Kryokonservierung bedingte histopathologischen Veränderungen gefunden werden.

Die Arbeitsgruppe von Buján führte eine experimentelle Studie durch, in der sie die rechte und linke A. iliaca communis von Schweinen unter Allgemeinanästhesie entnahmen. Diese Gefäße wurden in 3 Gruppen geordnet. Die Gefäße der Gruppe 1 wurde bei +4°C gelagert und dienten als Kontrollgruppe (frische, nicht kryokonservierte Allografts). Die Gefäße der Gruppe 2 wurden in einem MEM-Medium unter Zusatz von 10% DMSO bei -196°C konserviert. In der Gruppe 3 wurden die Gefäße in einem UW-Medium wiederum mit dem Zusatz von 10% DMSO bei -196°C konserviert. Nach Konservierung erfolgte der rasche Auftauprozess in +37°C warmer Kochsalzlösung. Hierbei beobachteten sie sowohl in der Gruppe 2 als auch in der Gruppe 3 induzierte Veränderungen der Permeabilität der Gefäßwände. Des Weiteren detektierten sie Flüssigkeitsansammlungen, geschwollene Endothelzellen und Enzyme, die eine Zersetzung der

Gefäßwand hervorriefen. Die Summe der Beobachtungen könnte aus der Sicht der Arbeitsgruppe zu einem Allograft-Versagen nach Implantation des Gefäßes führen [Buján 2000].

In einer anderen Arbeit wurden Brüche der Gefäßwände der A. carotis von Kaninchen durch das Einfrieren bei -160°C beschrieben. Bei einer Gefriertemperatur von nur -80°C konnten diese Brüche verhindert werden [Hunt 1994]. Eine weitere Untersuchung von Pegg und Mitarbeitern führte die makroskopisch sichtbaren Brüche der Gefäßwände, die bei über 75% der kryokonservierten Karotiden der Kaninchen auftraten, auf den thermischen Stress, der während des Einfrierens, der Kryokonservierung und des raschen Auftauprozesses auf das Gewebe einwirkt, zurück. Dabei beobachteten sie, dass auch in dieser Untersuchung eine Lagerung bei -80°C und eine langsamere Erwärmung des Allografts vor Implantation zu einer Reduktion der Gefäßwandbrüche und damit zur erhaltenen mechanischen Integrität des Allografts, führten [Pegg 1997].

Die untersuchten Gefäßabschnitte dieser Arbeit wurden ebenfalls bei -160°C konserviert. Es wurden auch in einigen Fällen Mikrodissektionen und Rupturen vornehmlich zwischen der Intima und der Media beobachtet, jedoch fanden sich diese Schäden sowohl in der T0- als auch in der T1-Gruppe der jeweiligen Probe. Daher wurden diese Veränderungen als Artefakte, die durch die Fixierung in Formalin, die Einbettung in Paraffin und das Schneiden der Paraffinblöcke entstanden sein können, gedeutet.

Eine andere Studie beobachtete Fissuren in Gefäßen von Versuchstieren, die durch die Kryokonservierung entstanden waren und brachte diese mit einer frühen Ruptur dieser innerhalb von wenigen Stunden nach der Implantation in Zusammenhang [Lehalle 1997]. Solche Beobachtungen wurden in unserer Studie nicht gefunden.

Die früheste Komplikation, die bei unserer Untersuchung auftrat, war ein thrombotischer Verschluss des arteriellen Allografts 2 Tage nach Implantation. Eine ursächliche Beziehung der Thrombusbildung zur Kryokonservierung ist unwahrscheinlich. Im vorliegenden Fall kommt möglicherweise eine ineffektive Antikoagulation bei diesem Patienten mit pAVK Satdium Iib in Betracht. Ferner könnten aber auch paraneoplastische Thromben, wie sie bei Karzinom-Patienten (zum Beispiel beim Pankreaskarzinom) beschrieben werden, auftreten. Im beschriebenen Fall ist jedoch keine Tumorerkrankung bekannt gewesen.

Veränderungen der Zellkerne, wie sie zum Beispiel bei intraoperativen Schnellschnitten auftreten, konnten in keiner Probe beobachtet werden. Solche histologischen Schnittpräparate werden ebenfalls flüssigem Stickstoff ausgesetzt, wodurch charakteristische Veränderungen des Gewebes auftreten. Allerdings findet dabei ein unkontrollierter Einfriervorgang statt, während die Gefäßallografts bei der Kryokonservierung wie bereits o.g. in einem speziellen Freezer

eingefroren werden, um Gewebeschäden möglichst zu vermeiden. Dafür wurden aber spezifisch erscheinende Auftreibungen (Ballonierungen) des Zytoplasmas der Myozyten überwiegend in der T1-Gruppe, aber auch in 3 Fällen der T0-Gruppe beobachtet. Schlussfolgernd konnte dieses histopathologische Merkmal daher nicht durch die Kryokonservierung beziehungsweise nicht allein durch sie entstanden sein, da sie ansonsten in keinem einzigen Fall der T0-Gruppe vorliegen dürfte. Es könnte sich vielmehr um ein Artefakt handeln, eventuell aber auch um eine präfinale Veränderung, die im Organspender vor der Entnahme aufgetreten ist. Dennoch ist unklar, warum sich diese histomorphologische Veränderung in 46% der T1-Proben wiederfand und im Vergleich dazu nur bei 3 Proben (9%) der T0-Gruppe. Weiterhin ist auch unklar, warum die Ausdehnung dieses histopathologischen Merkmals in der T1-Gruppe signifikant größer war ($p=0.021$). Trotzdem hatte die Ausprägung dieses Befundes keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf ($p=0.806$). Die in dieser Arbeit beschriebenen Auftreibungen des Zytoplasmas der Myozyten oder ähnliche Veränderungen wurden bisher in der Literatur noch nicht näher erwähnt. Auch Buján und Mitarbeiter konnten in ihrer Arbeit kaum Veränderungen der glattmuskulären Zellen der Media finden beziehungsweise wurden diese als Vakuolisierung/Vakuolisierung bezeichneten Veränderungen als Variationen der Anti-Aktin-Expression nach Kryokonservierung beschrieben [Buján 2000, Nataf 1996].

Für die Erfassung der Intaktheit der luminalen Oberfläche wurde das Endothel in der CD34 Immunhistologie beurteilt. Eine Reduktion des Endothels nach Kryokonservierung war auffällig, jedoch war diese Reduktion nicht signifikant ($p=0.187$). Obwohl die Endothelschädigung in der Literatur schon mehrfach erwähnt wurde [Buján 2000, Hunt 1994, Pegg 1997] und auch ein Transplantatversagen mit dieser Schädigung postuliert wurde, konnten wir keinen eindeutigen Zusammenhang mit postoperativen Komplikationen in unserer Arbeit finden. Es gab keine signifikante Korrelation zum klinischen Verlauf ($p=0.451$). Die beobachteten Schädigungen des Endothels in der T0-Gruppe könnten auf systemische Entzündungen oder Hypoxie des hirntoten Spenders zurückzuführen sein. Außerdem könnten diese Veränderungen schon während der Explantation des Gefäßes vom hirntoten Organspender, der Säuberung oder durch die histologische Aufarbeitung des Gewebes entstanden sein. Weiterhin könnte, wie Buján und Mitarbeiter bereits in ihrer Studie annahmen, der fehlende intraluminale Druck durch die Blutsäule zu einem Kollaps des Gefäßallografts und damit zur Schädigung des Endothels führen [Buján 2000]. Höchstwahrscheinlich wurden die beschriebenen Defekte des Endothels nach Implantation reendothelialisiert, wie es auch nach Implantationen von Stents oder biologischen Materialien, wie zum Beispiel bei biologischen Herzklappen, beobachtet werden kann [Bär 2009]. Obwohl die Beurteilung des Endothels bisher keine klinische Relevanz besitzt, erscheint

es empfehlenswert, die CD34-Immunhistologie zur standardisierten histopathologischen Untersuchung der arteriellen Allografts aufzunehmen, um eventuelle postoperative Komplikationen in einem größeren Kollektiv zu detektieren.

4.2. Vorbestehende pathologische Schädigungen

Überraschenderweise wurden in den untersuchten Proben der allogenen Gefäßersätze in über 40% fortgeschrittene arteriosklerotische Läsionen gefunden. In der Literatur wurde das Vorhandensein beziehungsweise die Klassifizierung der Arteriosklerose der Gefäßallografts bisher noch nicht beschrieben.

Da aber immer mehr ältere Organspender akzeptiert werden, steigt auch das Risiko der Arteriosklerose, die vor allem im zunehmenden Alter häufig auftritt (Tabelle 8). Daraus folgt, dass mit arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäßallografts in höherem Maße zu rechnen ist und daher wäre eine detaillierte Beschreibung und Klassifizierung der Arteriosklerose von Bedeutung, um aus diesen vorbestehenden Veränderungen eventuell Rückschlüsse auf auftretende Komplikationen des Gefäßallografts nach Implantation zu schließen. Obwohl in der vorliegenden Studie kein signifikanter Einfluss der Arteriosklerose auf den klinischen Verlauf zu beobachten war ($p=0.265$), wäre die Klassifikation der Arteriosklerose eine allgemeine Empfehlung für die standardisierte Beurteilung der Gefäßallografts, um eventuelle Komplikationen wie Rupturen und Ausbildung von Aneurysmen zu verhindern.

Des Weiteren sollte die Degeneration der Media standardisiert beurteilt werden. Hierbei wären vor allem die Intaktheit der elastischen Fasern, die Degeneration der glatten Muskelzellen und Muzinanreicherungen in der Media als Kriterien zu untersuchen.

Obwohl diese Veränderungen nicht mit dem klinischen Verlauf korrelierten, konnten diese Merkmale trotzdem in jeder Probe detektiert werden. Erstaunlicherweise fanden sich insbesondere nach Kryokonservierung signifikant vermehrt Muzinanreicherungen ($p=0.026$) und Risse der elastischen Fasern ($p=0.004$). Dies entsprach nicht den Erwartungen, da die Muzinanreicherungen, die ein Kriterium für eine Mediadegeneration darstellen könnten, als ein eigentlicher intravitaler Prozess angenommen wurde und nicht als eine durch künstliche Abläufe hervorgerufene Veränderung.

Ferner könnten diese Anreicherungen des Muzins auch mit den Schädigungen der elastischen Fasern einhergegangen sein. So konnten auch in der bereits vielzitierten Studie von Buján und

Mitarbeitern Schäden der Media detektieren werden [Buján 2000]. Der Aufbau der Fasern und damit der Matrix eines Gefäßes vor und nach Kryokonservierung wurde auch schon mit Hilfe des x-ray Tests/Diffraktion untersucht. Dabei ergaben sich keine Schädigungen des Gefäßaufbaus durch den Einfrier- und Auftauprozess. Hierbei konnten Pérez und Mitarbeiter an kryokonservierten Aorten und Carotiden im Vergleich zu frischen Allografts keine Schäden des Kollagens aufzeigen. Es gab zwar Strukturveränderungen, aber diese gingen nicht mit einem biomechanischen Funktionsverlust des allogenen Gefäßersatzes einher [Pérez Campos 2008]. Außerdem wurden in einer Studie von Bia und Mitarbeitern die mechanischen Eigenschaften von frischen (Gruppe 1) und kryokonservierten (Gruppe 2) Allografts untersucht. Es gab keinen signifikanten Unterschied der biomechanischen Funktion zwischen den zwei Gruppen [Bia 2006].

Bei einem explantierten allogenen Gefäßersatz, der primär bei einer aktiven Infektion implantiert wurde, zeigten sich eine nahezu azelluläre Media und vor allem neutrophile Leukozyten, kokkoide Bakterien und abszessähnliche Formationen. Anders als bei dem o.g. Beispiel aus der Literatur [Yamada 2006] waren die elastischen Fasern der explantierten Allografts in dieser vorliegenden Arbeit fast vollständig intakt. Außerdem konnte in dem untersuchten Patientenkollektiv keine eindeutige Infektion beziehungsweise Reinfektion nach Allograftimplantation bei vorbestehendem mikrobiologischem Nachweis von Keimen in der T0- und T1-Gruppe nachgewiesen werden. Trotz des mikrobiologischen Nachweises von *P. aeruginosa* in der T1-Gruppe wurde bei einem Patienten, der dieses Gewebe erhielt, keine klinisch relevante Infektion postoperativ nachgewiesen. In einem weiteren Beispiel konnte auch keine klinisch relevante Infektion bei dem mikrobiologischen Nachweis von *S. mitis* nachgewiesen werden. Der positive mikrobiologische Nachweis in der T0-Gruppe korrelierte nicht mit dem klinischen Verlauf. Das Keimspektrum, welches in der T0- und T1-Gruppe mikrobiologisch nachgewiesen werden konnte, entspricht dem, welches in verschiedenen Studien in der Literatur genannt wird [Wagstaff 1996, Nevelsteen 1998].

Trotz dieser Ergebnisse sollte zur Beurteilung der Media standardisiert die EvG- und die Alcian-Färbung in die Routinediagnostik aufgenommen werden, während die Immunhistologie für glattmuskuläres Aktin nicht zwingend notwendig erscheint und als zusätzliche Untersuchungsmethode in bestimmten Fällen herangezogen werden könnte.

4.3. Ursachen für das Versagen des Gefäßtransplantates

In den sechs Fällen, in denen es zu einer Explantation des allogenen Gefäßersatzes auf Grund eines Versagens kam, zeigten sich ausgeprägte Nekrosen und akute und chronische Entzündungsreaktionen [Yamada 2006].

Dies kann zum einen mit einer Infektion des allogenen Gefäßersatzes im Zusammenhang stehen. In keiner der T2-Proben ließ sich allerdings eine Infektion zweifelsfrei nachweisen. Histomorphologisch waren keine Mikroorganismen zu detektieren, was aber eine Infektion auch nicht ausschließt. Mikrobiologische Untersuchungen dieser Proben oder der Operationsgebiete waren nicht gemacht worden, so dass im Rahmen dieser retrospektiven Studie die Frage nach Protheseninfektion letztlich ungeklärt bleibt. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass allogene Gefäßersatzes im Gegensatz zu synthetischen Gefäßprothesen resistenter gegenüber Infektionen sind, daher werden sie auch als Therapieoption bei Protheseninfektionen eingesetzt [Vogt 1999, Koskas 1996, Mestres 1995]. Ferner können durch Verwendung von allogenen Gefäßersatzes komplizierte extra-anatomische Rekonstruktionen mittels Prothesen beziehungsweise autologen Gefäßen, die mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einhergehen, vermieden werden [Arbatli 2003]. Aber es gibt auch in der Literatur Beschreibungen von Allograftversagen auf Grund einer Reinfektion [Yamada 2006].

Natürlich konnten nur die explantierten Allografts histopathologisch untersucht werden. 15 Patienten starben auf Grund ihrer eigentlichen Erkrankung, die zum Gefäßersatz mit einem Allograft führte. Es erfolgte keine klinische Sektion in diesen Fällen, die den Zustand des allogenen Gefäßersatzes hätte beschreiben können. Mit dem vorliegenden Studiendesign war es daher nicht möglich, geringere Veränderungen beziehungsweise den physiologischen Einheilungsprozess der Allografts histologisch zu untersuchen.

Wegweisende Zeichen einer immunologischen Reaktion im Sinne einer Rejektion konnten in den T2-Proben nicht eindeutig gesichert werden. Falls solche Reaktionen vorhanden waren, dann wurden sie durch die Nekrosen und die dichten Entzündungsinfiltrate in den T2-Proben überlagert. Alternativ könnte man vermuten, dass die Nekrosen und Entzündungen Ausdruck einer schwer verlaufenden Rejektion waren, was allerdings ungewöhnlich wäre. Eine zelluläre Transplantatabstoßung beispielsweise bei Herz- oder Nierentransplantaten ist deutlich zellärmer und subtiler ausgeprägt. Vogt und Mitarbeiter untersuchten diesbezüglich 125 explantierte Gefäß- und Herzklappen-Allografts von Kindern und Erwachsenen. Anhand von immunhistologischen Färbungen erkannten sie bei allen pädiatrischen Patienten, jedoch nur bei

9% der erwachsenen Patienten, Entzündungsinfiltrate mit vornehmlich T-Lymphozyten (Antikörper: CD45RO, CD3 und CD43 für T-Lymphozyten), aber auch von B-Lymphozyten, Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen und Plasmazellen, die sie als Ausdruck einer akuten Rejektion verstanden [Vogt 1999]. So beschrieben Ruotolo und Mitarbeiter typische Zeichen einer chronischen Rejektion, die unter anderem auch mit dichten Entzündungsinfiltraten, Nekrosen der glattmuskulären Zellen und Proliferation der Intima einhergegangen waren [Ruotolo 1997]. Hierbei handelte es sich um ein kleines Kollektiv von 100 Patienten. Etwa 25% der Patienten zeigten in der Nachbeobachtungsphase von 2 Jahren Okklusionen beziehungsweise Ischämien, die eine Reoperation nach sich zogen. Die Ursache war vor allem die Intimaproliferation, aber es konnten auch die o.g. Veränderungen mikroskopisch beobachtet werden.

Es wurden auch keine direkten Einflüsse der Kryokonservierung auf die immunreaktiven Zellen der HLA Klasse I und II detektiert. HLA Klasse I-immunreaktive Zellen wurden in allen T1-Proben gefunden. Dies entspricht auch Ergebnissen anderer Studien [Pasquinelli 2007]. Dagegen korrelierte das Vorhandensein von HLA Klasse II-positiven Zellen nicht mit dem klinischen Verlauf. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um die Annahme, dass die kryokonservierten allogenen Gefäßersätze immunogen sind, wie es in einzelnen Tiermodellen beschrieben wurde [Solanes 2004 und 2005]. Jedoch hatte Motomura in einem Versuch mit Ratten eine Verdickung der Intima, Degeneration der Media und zelluläre Infiltrate in der Adventitia wie sie bei chronischen Rejektionen nach Organtransplantationen beschrieben werden, beobachtet [Montomura 1995].

Auch andere Studien untersuchten Allograft-Rejektionen. Dabei kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass Immunreaktionen und degenerative Veränderungen der Gefäßwandarchitektur für Dilationen und Rupturen der Allografts verantwortlich sein könnten [Couvelard 1995, Plissonnier 1995]. Die beschriebenen Merkmale wurden jedoch in ihrem Ausmaß durch die Kryokonservierung reduziert und waren vornehmlich bei frischen Gefäßersätzen zu finden.

Trotz dieser Annahme und hinsichtlich der hier beobachteten Ergebnisse sind die Immunhistologie für HLA Klasse I und II keine Standardfärbungen für die Routinediagnostik der arteriellen Allografts, da sie keine beziehungsweise kaum Aufschluss über eine mögliche Transplantatrejektion des Empfängers geben.

Auch die Detektion von nervalen Strukturen durch die S-100 Immunhistologie erbrachten keine nützlichen Informationen bezüglich des Zustandes des Gefäßallografts. Daher findet diese Färbung nach Ergebnissen dieser Arbeit auch keinen Eingang in die Routinediagnostik.

4. 4. Studienlimitation

Das Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit war heterogen hinsichtlich folgender Aspekte:

- a) der Art und des Ausmaßes der zum allogenen Gefäßersatz führenden Erkrankung,
- b) der Lokalisation und des Umfangs des operativen Eingriffs,
- c) des Alters der Patientinnen und Patienten und
- d) der vorbestehenden Komorbiditäten.

Daher war die Vergleichbarkeit der Fälle eingeschränkt und es war schwierig, die Einflüsse dieser Aspekte von den histopathologischen Merkmalen abzugrenzen. Statistische Signifikanzen ließen sich daher kaum herausarbeiten.

Weiterhin ist die Studie durch ihren retrospektiven Charakter limitiert. Die histopathologischen Befunde konnten durch umfangreiche Nachuntersuchungen zwar gezielt im Hinblick auf die Fragestellungen erhoben werden, aber hinsichtlich der klinischen Befunde konnte nur die archivierte Dokumentation ausgewertet werden, die ursprünglich nicht mit dem Ziel einer wissenschaftlichen Bearbeitung angelegt worden war. Es hatte keine Standardisierung von Nachuntersuchungsterminen gegeben, und die Untersuchungsmethoden beispielsweise die radiologischen Untersuchungen waren heterogen, sowohl hinsichtlich der Technik als auch der Untersuchenden.

Schließlich waren bestimmte Untersuchungen nicht erfolgt, die zur Klärung einiger Fragestellungen äußerst hilfreich gewesen wären. Hierbei sind insbesondere mikrobiologische Untersuchungen im Fall von Revisionsoperationen sowie Obduktionen bei verstorbenen Transplantatempfängern zu nennen.

Um eindeutige prognostische Aussagen über den Erfolg eines allogenen Gefäßersatzes zu treffen und genaue histologische Ein- und Ausschlusskriterien zur Verwendung von Spendergewebe festzulegen, sind daher weitere Studien sinnvoll. Dabei sollte es sich im Idealfall um prospektive Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv mit standardisierten Nachuntersuchungen handeln. Aufgrund der bisher nicht alltäglichen Verwendung dieser allogenen Gefäßersatzes wären auch Multicenter-Studien und Meta-Reviews hilfreich.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die histologischen Veränderungen von arteriellen Gefäßallografts vor und nach Kryokonservierung zu erfassen und zum postoperativen klinischen Verlauf in Beziehung zu setzen. Dazu wurde eine retrospektive Studie an 40 Patienten durchgeführt, in der Gewebeproben mit Routinefärbungen und immunhistologischen Färbungen analysiert und die zugehörigen Krankengeschichten ausgewertet wurden.

Die eingangs genannten Fragestellungen können wie folgt beantwortet werden:

1. Es konnten keine eindeutigen durch Kryokonservierung hervorgerufenen Schäden nachgewiesen werden. Jedoch könnten weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv Aufschluss über die in dieser Untersuchung beschriebenen Auftreibungen des Zytoplasmas der Myozyten in der Media geben.

2. Arteriosklerose und Mediadegenerationen wurden in einem großen Ausmaß in den untersuchten Proben gefunden. Es bestand keine signifikante Beziehung dieser histomorphologischen Merkmale mit dem klinischen Verlauf der Patienten.

3. Die folgenden histopathologischen Untersuchungen haben sich als sinnvoll für arterielle Allografts herausgestellt (zu untersuchende Merkmale in Klammern):

- a. HE (vitale Zellen bzw. Nekrosen, Arteriosklerose, Entzündung)
- b. CD34 (prozentualer Anteil des erhaltenen Gefäßendothels)
- c. EvG, Alcian (Mediadegeneration)

Diese Studie konnte für die klinische Relevanz der o.g. Merkmale keine eindeutigen Fakten liefern, da die histomorphologischen Veränderungen in keiner signifikanten Beziehung zum postoperativen Verlauf standen. Dennoch zeigten die o.g. Merkmale interessante Befunde, die bei einer standardisierten histopathologischen Routinediagnostik der Gefäßallografts und in weiteren Studien untersucht werden sollten.

4. Die Komplikationen, die in unserer Untersuchung im klinischen Verlauf auftraten waren thrombotische Verschlüsse der Gefäßallografts, die auch mit Extremitätenamputationen in 2 Fällen einhergegangen sind, hämodynamisch nicht relevante Stenosen, Blutungen bei Anastomoseninsuffizienzen, Ausbildung von Aneurysmen sowie lokale und systemische Infektionen bis zum Multiorganversagen und Tod des Patienten. Die untersuchten histomorphologischen Gefäßbefunde zeigten keine signifikanten Korrelationen mit diesen Komplikationen.

5. Nach Explantation des allogenen Gefäßersatzes konnten in dieser Studie vor allem eine azelluläre Media, dichte Entzündungsinfiltrate mit neutrophilen Granulozyten, abszessähnliche Formationen und Nekrosen der Media beobachtet werden.

6. Die oben genannten Komplikationen könnten durch/ auf:

a. immunologische Prozesse, wie sie bei akuter und chronischer Rejektion auftreten, hervorgerufen worden sein. Diese Hypothese muss in nachfolgenden Studien mit einem größeren Patientenkollektiv weiter untersucht werden.

b. Infektionen zurückgeführt werden. Dies konnte in der vorliegenden retrospektiven Untersuchung nicht nachgewiesen werden. In zukünftigen Studien sollten zwingend mikrobiologische Untersuchungen von explantierten Allografts und vom Operationsgebiet erfolgen, um diese Frage zu klären.

c. Vorschädigungen des allogenen Gefäßersatzes durch Arteriosklerose entstanden sein. So traten vermehrt Anastomoseninsuffizienzen, Aneurysmen und thrombotische Verschlüsse im untersuchten Patientenkollektiv auf.

d. eventuelle Schäden durch Kryokonservierung aufgetreten sein: Hierfür konnten in der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen Hinweise gefunden werden.

Letztlich ließ sich mittels der vorliegenden retrospektiven Studie nicht klären, welche Umstände zum Versagen der Allografts führten.

7. Konkrete Grenzen der Verwendbarkeit von Allografts, beispielsweise hinsichtlich des Schweregrades arteriosklerotischer Veränderungen, einer Mediadegeneration oder eines Verlustes der Intimaauskleidung, ließen sich nicht ableiten, da diese Merkmale keine signifikanten Korrelationen mit postoperativen Komplikationen zeigten.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Riede UN, Schaefer HE, Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag 1999/2001.
- 2) Bühling, KJ, Lepenies J, Witt K, Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage, Urban und Fischer Verlag 2004.
- 3) Callow AD. Arterial homografts. Eur J Vasc Endovasc Surg 1996;12:272-281.
- 4) Carrell A. Ultimate result of aortic transplantation. J Exp. Med 1912;15:389-398.
- 5) Gross RE et al., Preliminary observations on the use of human arterial grafts in the treatment of certain cardiovascular defects. New Eng J Med 1948;239:578-579.
- 6) Dubost C, Oeconomos N, Durand M, Metianu C. Greffe d'artère humaine conservée. Semaine des Hopitaux de Paris 1950;87:4497-4500.
- 7) Larena-Avellaneda A. Gefäßkunst und Kunstgefäße – von den Anfängen der Gefäßchirurgie zum modernen Gefäßersatz. Viszeralchirurgie 2007;42:108-115.
- 8) Oudot J. Greffe de la bifurcation aortique depuis les artères rénales jusqu'aux artères iliaques externes pour thrombose artérielle. Mém. Acad. Chir. 1951;77:642-645.
- 9) Vogt PR, von Segesser LK, Goffin Y, et al. Eradication of aortic infection with the use of cryopreserved arterial homografts. Ann Thorac Surg 1996; 62:640-645.
- 10) Goffin YA, Grandmougin D, Wozniak G, et al. Banking and distribution of large cryopreserved arterial homografts in Brussels: assessment of 4 years of activity by the European Homograft Bank (EHB) with references of implantation results in reconstruction of infected infra-renal arterial prostheses and mycotic aneurysms. Vasc Surg 1998; 32:19-32.

- 11) Mestres CA, Mulet J, Pomar JL. Large-caliber cryopreserved arterial allografts in vascular reconstructive operations: early experience. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:105-107.
- 12) Knosalla C, Weng Y, Yankah AC, et al. Using aortic allograft material to treat mycotic aneurysms of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:146-152.
- 13) da Gama D, Sarmento C, Vieira T, do Carmo G. The use of arterial homografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation. *J Vasc Surg* 1994;20:271-278.
- 14) Lesèche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and myotic aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001;34:616-622.
- 15) Brown KE, Heyer K, Rodriguez H, Eskandari MK, Pearce WH, Morasch MD. Arterial reconstruction with cryopreserved human allografts in the setting of infection: A single-center experience with midterm follow-up. *J Vasc Surg* 2009;49:660-666.
- 16) Gabriel M, Pukacki F, Dzieciuchowicz L, Oszkinis G, Checinski P. Cryopreserved Arterial Allografts in the Treatment of Prosthetic Graft Infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:590-596.
- 17) Noel A, MD, Gloviczki P, MD, Cherry KJ,Jr, MD, Safi H, MD, Goldstone J, MD, Morasch MD, MD, Johansen KH, MD, and Members of the United States Cryopreserved Aortic Allograft Registry. Abdominal aortic reconstruction in infected fields: Early results of the United States Cryopreserved Aortic Allograft Registry. *J Vasc Surg* 2002;35:847-852.
- 18) Eugène M, Gerota J. Cryopreserved aortic allograft replacement of infected prosthetic grafts in man: processing and clinical results. *Transpl Int* 1998;11:452-454.
- 19) Wagstaff SA, Grigg MJ. Arterial homografts-a possible solution to an infective dilemma. *Cardiovasc Surg* 1996;6:796-800.

- 20) Nevelsteen A, Goffin Y, Lacroix H, Vandeginste N, Suy R. Recurrent aortic infection: treatment by arterial homograft replacement. *Cardiovasc Surg* 1995;4:441-444.
- 21) Nevelsteen A, Feryn T, Lacroix H, Suy R, Goffin Y. Experience with cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *Cardiovasc Surg* 1998;4:378-383.
- 22) Zegelmann M, Günther G, Freytag C, Zühlke H, Storck M, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie) (DGG), 2008.
- 23) Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 2004;39:1009-1017.
- 24) Settmacher U, Langrehr JM, Husmann I, Eisele R, Bahra M, Heise M, Neuhaus P. Viszeralarterienrekonstruktionen mit Homografts bei Resektionen des Pankreas. *Chirurg* 2004;75:1199-1206.
- 25) Gómez-Caro A, Martínez E, Rodríguez A, Sanchez D, Martorell J, Gimferrer JM, Haverich A, Harringer W, Pomar JL Macchiarini P. Cryopreserved arterial allograft reconstruction after excision of thoracic malignancies. *Ann Thorac Surg* 2008;86:1753-1761.
- 26) Vogt PR, Turina MI. Management of infected aortic grafts: Development of less invasive surgery using cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1986-1989.
- 27) Vogt PR, Brunner-LaRocca HP, Lachat M, Ruef C, Turina MI. Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: influence on early and midterm mortality. *J Vasc Surg* 2002;35:80-86.
- 28) Guy L, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001;34:616-622.

- 29) Schroeder A, Meierling S, Riepe G, Braun S, Imig H. Aortobifemoral prosthetic infection treated by cryopreserved arterial homograft of the European Homograft Bank. *VASA* 1999;28:42-45.
- 30) Kieffer E, Bahnini A, Koskas F, Ruotolo C, Le Blevec D, Plissonnier D. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J Vasc Surg* 1993;17:349-355.
- 31) Koskas F, Goeau-Brissonniere O, Nicolas MH, Bacourt F, Kieffer E. Arteries from human beings are less infectible by *Staphylococcus aureus* than polytetrafluoroethylene in an aortic dog model. *J Vasc Surg* 1996;23:472-476.
- 32) Vogt PR, Pfammatter T, Schlumpf R, Genoni M, Kunzil A, Candinas D et al. In situ repair of aortobronchial, aortoesophageal, and aortoenteric fistulas with cryopreserved aortic homografts. *J Vasc Surg* 1997;26:11-17.
- 33) Knosalla C, Goeau-Brissonniere O, Leflon V, Bruneval P, Eugene M, Pechere JC, et al. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study. *J Vasc Surg* 1998;27:689-698.
- 34) Motomura N, Imakita M, Yutani C, Takamoto S, Kitoh Y, Tsuji T, Kawashima Y, Wada Y, Oka T. Histologic modification by cryopreservation in rat aortic allografts. *Ann Thorac Surg* 1995;60(2 Suppl):168-171.
- 35) Lehalle B, Geschier C, Fiévé G, Stoltz JF. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. *J Vasc Surg* 1997;25:751-752.
- 36) Langerak S, Groenink M, Van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, Van Baal MC, Spaan JAE. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int* 2001;14:248-255.
- 37) Fischlein T, Schütz A, Haushofer M, Frey R, Uhlig A, Detter C, Reichart B. Immunologic Reaction and Viability of Cryopreserved Homografts. *Ann Thorac Surg* 1995;60:122-126.

- 38) Ochsner JL, Decamp PT, Leonard GL. Experience with fresh venous allografts as an arterial substitute. *Ann Surg* 1971;173:933-939.
- 39) Boren HC, Roon AJ, Moore WS. Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation. *Surgery* 1978;83:382-391.
- 40) Gournier JP, Adham M, Favre JP, Raba M, Bancel B, Lepetit JC, Barral X. Cryopreserved arterial homografts: preliminary study. *Ann Vasc Surg* 1993;7:503-511.
- 41) Cochran RP, Kunzelman KS. Cryopreservation does not alter antigenic expression of aortic valves. *J Surg Research* 1989;46:597-599.
- 42) Gauss RW, Hazekamp MG, van Vilet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:2003-2010.
- 43) Mirelli M, Stella A, Faggioli GL, Scolari P, Iannelli S, Freyrie A, Buscaroli A, De Santis L, Resta F, Bonomini V, D'Addato M. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;18:424-429.
- 44) Eastcott HHG, Hufnagel CA. The preservation of arterial grafts by freezing. *SurgForum* 1950:269-274.
- 45) Marrangoni A, Cecchini L. Homotransplantation of arterial segments preserved by the freeze-drying method. *Ann Surg* 1951;134 (6):977-983.
- 46) Buján J, Bellón JM. Rapid Thawing Increases the Fragility of the Cryopreserved Arterial Wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:13-20.
- 47) Bateson EAJ, Pegg DE. Cryopreservation of Arteries. Selection of a model for human small elastic arteries. & Preliminary results of preservation of ring-segments with dimethyl sulphoxide. *Cryo-Letters* 1994;15:15-26.

- 48) Wassenaar C, Wijsmuller EG, Van Herwerden LA, Aghai Z, Van Tricht CL, Bos E. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. *Ann Thorac Surg* 1995;60(2 Suppl):S165-167.
- 49) Nagasaka S, Taniguchi S, Nakayama Y, Sakaguchi H, Nishizaki K, Naito H, Morioka H. In vivo study of the effects of cryopreservation on heart valve xenotransplantation. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:70-79.
- 50) Hof H, Dörries R, *Medizinische Mikrobiologie*; 3., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage, Thieme 2005;19-32.
- 48) Boenisch T. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*, 3. Auflage, DakoCytomation Corp.,2003;5-83.
- 49) Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1262-1275.
- 50) Hunt CJ, Song YC, Bateson EAJ, Pegg DE. Fractures in Cryopreserved Arteries. *Cryobiology* 1994;31:606-515.
- 51) Ruotolo C, Plissonier D, Bahnini A, Koskas F, Kieffer E. In situ arterial allografts: a new treatment for aortic prosthetic infection. *Eur J Endovasc Surg* 1997;14:102-107.
- 52) Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology* 1997;34:183-192.
- 53) Nataf P, Guettier C, Bourbon A. allograft preparation techniques on chronic vascular rejection: a histological study. *Transplant Proc* 1996;28:2890-2982.
- 54) Bär A, Dorfman SE, Fischer P, Hilfiker-Kleiner D, Cebotari S, Tudorache I, Suprunov M, Haverich A, Hilfiker A. The pro-angiogenic factor CCN1 enhances the re-endothelialization of biological vascularized matrices in vitro. *Cardiovasc Res* 2010;85 (4):806-813.

- 55) Pérez Campos H, Saldías MC, Silva W, Machin D, Suescun L, Faccio R, Mombrú AW, Alvarez I. Control of cryopreservation procedures on blood vessels using fiber x-ray diffraction. *Transplant Proc* 2008;40:668-674.
- 56) Bia D, Pessana F, Armentano R, Pérez H, Zócalo Y, Saldías M, Perez N, Alvarez O, Silva W, Machin D, Sueta P, Ferrin S, Acosta M, Alvarez I. Cryopreservation procedures does not modify human carotid homografts mechanical properties: an isobaric and dynamic analysis. *Cell Tissue Bank* 2006;7 (3):183-194.
- 57) Yamada A, Okada K, Takahashi R, Okita Y. Pathologic features of cryopreserved aortic allograft implanted in the active infection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Jul;132(1):203-204.
- 58) Vogt PR, Stallmach T, Niederhäuser U, Schneider J, Zünd G, Lachat M, Künzli A, Turina MI. Explanted cryopreserved allografts: a morphological and immunohistochemical comparison between arterial allografts and allograft heart valves from infants and adults. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 1999;15:639-645.
- 59) Arbatli H, DeGeest R, Demirsoy E, Wellens F, Degrieck I, VanPraet F, Kubilay Korkut A, Vanermen H. Management of infected grafts and mycotic aneurysms of the aorta using cryopreserved homografts. *Cardiovasc Surg.* 2003;11:257-263.
- 60) Pasquinelli G, Pistillo MP, Ricci F, Buzzi M, Tazzari PL, Foroni L, Manfredini C, Ceccarelli C, Stella A, Conte R. The “in situ” expression of human leukocyte antigen class I antigens is not altered by cryopreservation in human arterial allografts. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(3):195-203.
- 61) Solanes N, Rigol M, Castella M. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy. *Transplant Proc* 2004;36:3288-3294.
- 62) Solanes N, Rigol M, Khabiri E. Effects of cryopreservation on the immunogenicity of porcine arterial allografts in early stages of transplant vasculopathy. *Cryobiology* 2005;51:130-141.

- 63) Couvelard A, Leseche G, Scoazec JY, Groussard O. Human allograft vein failure: immunohistochemical arguments supporting the involvement of an immune-mediated mechanism. *Hum Pathol* 1995;26:1313-1320.

- 64) Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, et al. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995;60:414-424.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

HE	H ämatoxylin- E osin
EvG	E lastica van G ieson
RPMI	Zellkulturmedium, welches in den 1960er Jahren am R oswell P ark M emorial I nstitute hergestellt wurde
DMSO	D i M ethyl- S ulfoxid
AVK	a rterielle V erschlusskrankheit
pAVK	p eriphere a rterielle V erschlusskrankheit

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 RPMI-1640 Medium
- Abbildung 2 Frisch entnommene allogene Blutgefäße in der Konservierungslösung
- Abbildung 3 Anordnung des Freezers mit Flüssigstickstoff in der Charité Campus Virchow Klinikum, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
- Abbildung 4 Aufbewahrungsmaterial der Allografts
- Abbildung 5 Aufbewahrungsbehältnisse der Allografts
- Abbildung 6 Beispiel für künstlich hervorgerufene Schädigungen bzw. Risse zwischen Intima (lange Pfeile) und Media (kurze Pfeile), vor Kryokonservierung. HE, 50fache Vergrößerung
- Abbildung 7 Risse zwischen Intima (lange Pfeile) und Media (kurze Pfeile), nach Kryokonservierung. HE, 50fache Vergrößerung
- Abbildung 8 Aufgetriebenes Zytoplasma der glattmuskulären Zellen der Media (Pfeile), vor Kryokonservierung. HE, 200fache Vergrößerung
- Abbildung 9 Aufgetriebenes Zytoplasma der glattmuskulären Zellen der Media (Pfeile), nach Kryokonservierung. HE, 200fache Vergrößerung
- Abbildung 10 Beispiel für verbliebene Endothelzellen (Pfeile, braune immunhistologische Reaktion), nach Kryokonservierung. CD 34-Immunhistologie. 100fache Vergrößerung
- Abbildung 11 Erheblicher Verlust der elastischen Fasern (Ovale), nach Kryokonservierung. EvG, 100fache Vergrößerung

- Abbildung 12 Muzinablagerungen (Ovale), nach Kryokonservierung.
Alcian, 100fache Vergrößerung
- Abbildung 13 Immunreaktive Zellen (braune Anfärbung), nach Kryokonservierung.
HLA Klasse I Immunhistologie, 200fache Vergrößerung
- Abbildung 14 Darstellung nekrotischer Areale (Oval) und dichter, abszessähnlicher akuter Inflammation (kurze Pfeile), nach Explantation.
HE, 50fache Vergrößerung
- Abbildung 15 Darstellung chronischer Inflammation (lange Pfeile) und chirurgischer Materialien (Pfeilspitzen), nach Explantation.
HE, 50fache Vergrößerung
- Abbildung 16 Kompletter Verlust der Intima (Stern), azelluläre Media ohne elastische Fasern, nach Explantation.
HE, 50fache Vergrößerung
- Abbildung 17 Fibrotische Adventitia mit Lymphozyten-Aggregation, nach Kryokonservierung.
HE, 100fache Vergrößerung

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Indikationen und Art bzw. Lokalisation des Eingriffs
Tabelle 2	Auszug aus der Homograft-Bank der Charité, Campus Virchow Klinikum, Stand 05.11.2003
Tabelle 3	Aufstellung der untersuchten Fälle in Bezug auf eventuelle Komplikationen/ Revisionseingriffe/ Tod und des progressfreien Intervalls
Tabelle 4	Semiquantitative Evaluation (von 0=normal bis 3=pathologisch) der Diskontinuität der elastischen Fasern, der Degeneration der glattmuskulären Zellen und der Muzinablagerungen als Merkmal für die Degeneration der Media. Mittelwert, arithmetisches Mittel, Standardabweichung, T0=Proben vor Kryokonservierung, T1=Proben nach Kryokonservierung und Auftauprozess, Signifikanz $p < 0.05$
Tabelle 5	Übersicht der Merkmale von Empfänger und Spender, Implantationsindikationen, Komplikationen und histologische Merkmale der 6 explantierten Allografts. m=männlich, w=weiblich, n=nicht evaluierbar, ng=neutrophile Granulozyten, lc=Lymphozyten, mp=Makrophagen
Tabelle 6	Mikrobielle Besiedlung verschiedener Proben vor und nach Kryokonservierung
Tabelle 7	Anzahl (in Prozent) der arteriosklerotischen Veränderungen in den T0- und T1- Proben anhand histopathologischer Kriterien nach Virmani et al. 2000
Tabelle 8	Korrelation des Spenderalters und den ausgeprägtesten arteriosklerotischen Veränderungen

7.4. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Monique Pötzsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Histomorphologische Evaluation arterieller Allografts nach Kryokonservierung‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.6. Danksagung

Besonderen Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Lars Morawietz, Chefarzt der Pathologie im Klinikum Ernst von Bergmann, Potsdam, für die Überlassung des Themas, die fachliche Beratung, die Unterstützung zu jeder Zeit, die motivierenden Worte und seine Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Robert M. Eisele, Oberarzt der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, bedanken, der mich auch jederzeit fachlich und geduldig begleitete.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel, Direktor des Institutes für Pathologie Campus Charité Mitte.

Zudem bedanke ich mich bei Gabriele Fernahl, MTA, für ihre kompetente Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Aber auch meiner Familie gilt großer Dank, da sie mich motivierte und die nötige Geduld in der Zeit aufbrachte.

Vielen Dank!