

Aus dem Institut für Physiologie
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Andreas Deußen

**Untersuchungen zur Gefäßfunktion der
humanen A. mammaria interna nach Kaltlagerung
in Kombination mit
antimikrobieller Dekontamination**

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Franziska Vogel

aus Magdeburg

Dresden 2018

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

gez.:

Vorsitzender der Promotionskommission

Anmerkung:

Die Eintragung der Gutachter und Tag der mündlichen Prüfung (Verteidigung) erfolgt nach Festlegung von Seiten der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Die oben genannten Eintragungen werden durch die Doktoranden nach der Verteidigung zwecks Übergabe der fünf Pflichtexemplare an die Zweigbibliothek Medizin in gedruckter Form oder handschriftlich vorgenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungen	vii
Tabellen	xi
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Arterien	3
2.1.1 Endothelfunktion	4
2.1.2 Funktion der glatten Muskelzellen	6
2.2 Gefäßtransplantation	7
2.2.1 Definition und gesetzliche Regelungen	7
2.2.2 Verwendung von Gefäßtransplantaten in der Klinik	8
2.2.3 Konservierungsmethoden	9
2.2.4 Schädigungsmechanismen bei Kaltlagerung von Gefäßen	10
2.2.5 Verwendung antimikrobiellen Dekontaminationsstoffen	14
2.2.6 Eigenschaften der verwendeten antimikrobiellen Stoffe	16
2.3 Fragestellung	26
3 Methodik und Material	27
3.1 Chemikalien und Lösungen	27
3.2 Vorbereitung der arteriellen Gefäße	28
3.2.1 Verwendete Arterien	28
3.2.2 Chirurgische Gewinnung der Arteriensegmente	28
3.2.3 Vorbereitung der Arteriensegmente	29
3.2.4 Dekontaminationslösungen und Lagerungszeiten	29
3.3 Untersuchungsmethode für die Gefäßfunktion	30
3.3.1 Versuchsaufbau und -vorbereitung	30
3.3.2 Versuchsprinzip und -ablauf	32
3.3.3 Datenerfassung und Auswertung	36
3.4 Stabilitätsmessungen der einzelnen Stoffe	37
3.4.1 Stabilitätsmessung Taurolidin	38
3.5 LDH-Messungen	40

3.6	Keimzahlbestimmung	41
3.7	Statistik	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente	42
4.1.1	Rezeptorunabhängige Kontraktion mittels KPSS	43
4.1.2	Rezeptorabhängige Kontraktion mittels Noradrenalin	44
4.1.3	Stabilitätsmessungen der Kontraktionsplateaus unter Noradrenalin	46
4.1.4	Kontraktionsvergleich der einzelnen Substanzen nach 24h Lagerung	51
4.2	Relaxationsverhalten der Arteriensegmente	54
4.2.1	Endothelabhängige Relaxation mittels Acetylcholin	56
4.2.2	Endothelunabhängige Relaxation mittels Natriumnitroprussid	57
4.2.3	Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente durch Acetylcholin als Konzentrations-Wirkbeziehung	59
4.2.4	Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente durch SNP als Konzentrations- Wirkbeziehung	65
4.2.5	Relaxationsverhalten der einzelnen Substanzen nach 24h Lagerung	71
4.2.6	Inhibition der Einzelkomponenten der endothelabhängigen Relaxation	75
4.3	Vergleich der Stabilitätsmessungen einzelner Stoffe	90
4.3.1	Stabilitätsmessungen von Taurolidin	91
4.4	Ergebnisse der LDH-Messungen	92
4.5	Vergleich der Patientendaten	94
5	Diskussion	96
5.1	Die Bedeutung einer guten Gefäßfunktion	97
5.1.1	Kontraktionseigenschaften der Arteriensegmente	97
5.1.2	Relaxationseigenschaften der Arteriensegmente	100
5.1.3	Inhibition von Signalwegen der endothelabhängigen Vasodilatation	103
5.2	Vergleich der Stabilitätsmessungen einzelner Substanzen	104
5.3	Die Überprüfung der Toxizität mittels LDH	105
5.4	Grenzen dieser Studie	106
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	108
6	Zusammenfassung	110
6.1	Zusammenfassung	110
6.2	Summary	112
	Literatur	114
A	Allgemeine Angaben	129
A.1	Erklärung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens	129
A.2	Erklärung über die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben	130
A.3	Lebenslauf	131

A.4	Danksagung	133
B	Weiterführende Tabellen und Abbildungen	134
B.1	Diagramme aus Abschnitt 4.1.3 Stabilitätsmessungen der Kontraktionsplateaus von NA .	134
B.2	Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.3 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch ACh-Stimulation	135
B.3	Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.4 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch SNP-Stimulation	137
B.4	Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.6 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach ACh-Stimulation der Inhibitorengruppen 2 und 3	139
B.5	Colorimetrische Bestimmung von Taurolidin-Metaboliten	144

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AB1	Antibiotikamixtur 1
AB2	Antibiotikamixtur 2
AC	Adenylatzyklase
ACE-Hemmer	Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
Apa	Apamin
AT-II-Rezeptor-Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Clindamycin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Zytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
CTX	Charybdotoxin
CYP	Cytochrom P
DGFG	Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation
d. h.	das heißt
EC ₅₀	halbmaximale Wirkkonzentration
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing Faktor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EHB	European homograft bank
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Fluconazol
G	Gentamicin
ggf.	gegebenenfalls
GSH	Glutathion

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
I	Itraconazol
Indo	Indomethacin
iNOS	induzierbare NOS
IP	Prostazyklin-Rezeptor
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-trisphosphat
K _{Ca} -Kanal	kalziumaktivierter Kaliumkanal
KISS	Krankenhaus Infektions-Surveillance-System
KPSS	kaliumangereicherte physiologische Salzlösung
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
M	Metronidazol
max.	maximal
mg	Milligramm
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplexe
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten Phosphatase
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
nNOS	neuronal NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NRZ	nationale Referenzzentrum
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , auch Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor
PSS	Physiologische Salzlösung
PTFE	Polytetrafluorethylen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	Sodium nitroprusside
Tau	Taurolidin
TiP	TiProtec [®]
TRPC1	canonical transient receptor potential channel 1
TRPV4	vanilloid transient receptor potential channel 4
u. a.	unter anderem
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
V.	Vena
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs	versus
Wo	Woche
z. B.	zum Beispiel

Abbildungen

2.1	Pharmakokinetik von Taurolidin (Stendel, 2006)	24
3.1	Versuchsaufbau Myograph, entnommen aus der Arbeit von (Garbe, 2011), A) Myograph Modell 610M der Firma DMT, B) Skizzierte Darstellung einer Organbadeinheit und vergrößertes Bild der Edelstahlkammer, C) Aufgespannter Gefäßring der A. mammaria interna auf die Metallpins	31
3.2	Originale Ruhedehnungskurve (Kraft [mN], Zeit [min])	32
3.3	Ermittlung des inneren Gefäßumfangs (IC_{100}) (Garbe, 2011)	33
3.4	Originalregistrierung der Kontraktion mittels NA und der KWKs von ACh und SNP (Kraft [mN], Zeit [min])	35
4.1	Rezeptorunabhängige Wandspannungsentwicklung unter KPSS. Darstellung der Lagerungslösungen zu unterschiedlichen Lagerungszeiten. Der zentrale Punkt stellt den Mittelwert dar. Die Fehlerbalken werden als 95%- Konfidenzintervall (CI 95%) angegeben. .	44
4.2	Rezeptorabhängige Wandspannungsentwicklung unter Noradrenalin. Darstellung der Lagerungslösungen zu unterschiedlichen Lagerungszeiten.	45
4.3	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 2 Stunden	47
4.4	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden	48
4.5	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 1 Woche	48
4.6	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließen der Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec [®] -Lösung (48_1Wo)	49
4.7	Vergleich der maximalen Vasokonstriktion der einzelnen Substanzen der Dekontaminationslösungen unter KPSS	52
4.8	Vergleich der maximalen Vasokonstriktion der einzelnen Substanzen der Dekontaminationslösungen unter Noradrenalin	52
4.9	Vergleich der Wandspannungsentwicklung der Substanzgruppen während 10 min-Stimulation mit Noradrenalin nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in TiProtec [®] mit den unterschiedlichen Antibiotika-Zusätzen.	53
4.10	Darstellung einer Konzentrationswirkungskurve (KWK) am Beispiel von SNP R_{max} = gefitteter Maximalwert, EC_{50} -Wert = halbmaximale Vasodilatation	55

4.11 Endothelabhängige Vasodilatation durch ACh. Darstellung der maximalen Relaxation nach Lagerung in den unterschiedlichen Lagerungslösungen über unterschiedlichen Lagerungszeiten.	57
4.12 Endothelunabhängige Vasodilatation durch SNP. Darstellung der maximalen Relaxation nach Lagerung in den unterschiedlichen Lagerungslösungen über unterschiedlichen Lagerungszeiten.	58
4.13 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	59
4.14 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	61
4.15 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 1 Woche in den unterschiedlichen Lösungen.	63
4.16 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48_1Wo)	64
4.17 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	66
4.18 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	68
4.19 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 1 Woche in den unterschiedlichen Lösungen.	69
4.20 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48_1Wo).	70
4.21 Vergleich der Maximalwerte der Vasodilatation unter ACh nach 24h Lagerung in TiProtec®-Lösung mit Zusatz einer Einzelsubstanz	72
4.22 Vergleich der Maximalwerte der Vasodilatation unter SNP nach 24h Lagerung in TiProtec®-Lösung mit Zusatz einer Einzelsubstanz	72
4.23 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der endothelabhängigen Relaxationsantwort der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden	73
4.24 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der endothelunabhängigen Relaxationsantwort der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden	74
4.25 Maximalwerte für die endothelabhängige Vasorelaxation bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 1 (L= L-NMMA)	77
4.26 Maximalwerte für die endothelabhängige Vasorelaxation bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 2 (L= L-NMMA; I= Indomethacin)	77
4.27 Maximale Vasorelaxation der Inhibitorgruppe 3 (L= LNMMA, I= Indomethacin, A= Apamin, C= Charybdotoxin)	78

4.28	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden	80
4.29	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden	81
4.30	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48h_1Wo)	82
4.31	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden	83
4.32	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden	84
4.33	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48h_1Wo)	86
4.34	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden	87
4.35	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden	88
4.36	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48h_1Wo)	89
4.37	Stabilitätsmessung von Taurolidin in TiProtec®-Lösung kombiniert mit einem Arterien-segment	92
4.38	Laktatdehydrogenase-Messungen in ausgewählten Versuchsgruppen (*Ausreißer), 48h_1Wo = Lagerung der Gefäßsegmente 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung	93
B.1	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden	134
B.2	Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 96 Stunden	134
B.3	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	135
B.4	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	136
B.5	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	137
B.6	Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.	138
B.7	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden	139

B.8	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden	140
B.9	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 1 Woche	141
B.10	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden	142
B.11	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden	142
B.12	Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 1 Woche	143
B.13	Taurolidin in Aqua dest. zum Zeitpunkt 0 h	144
B.14	Taurolidin in TiProtec® zum Zeitpunkt 0 h	144
B.15	Taurolidin in Aqua dest. nach 4 Tagen Lagerungszeit	145
B.16	Taurolidin in TiProtec® nach 4 Tagen Lagerungszeit	145
B.17	Taurolidin in Aqua dest. nach 7 Tagen Lagerungszeit	146
B.18	Taurolidin in TiProtec® nach 7 Tagen Lagerungszeit	146

Tabellen

2.1	Zusammensetzung verschiedener Protektionslösungen	13
2.2	Beispiele für publizierte Dekontaminationslösungen	15
2.3	Anteil der häufigsten nachgewiesenen Erreger [%] bei postoperativen Wundinfektionen je nach Fachgebiet. (Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2012)	16
2.4	Langzeitergebnisse von Erregern in Gefäßtransplantaten (1990-2006) (Ali et al., 2009) .	17
2.5	Ergebnisse über empfindliche Mikroorganismen (M) gegenüber Gentamicin (Rote Liste Service GmbH, 2014)	18
2.6	Ergebnisse über empfindliche Mikroorganismen (M) gegenüber Clindamycin (Rote Liste Service GmbH, 2016)	19
2.7	Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln oder sonstigen Substanzen (Rote Liste Service GmbH, 2013)	20
2.8	In-vitro-Wirksamkeit von Metronidazol (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2017b)	20
2.9	In vitro-Aktivitätsspektrum von Flucloxacillin (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2017a)	21
2.10	In-vitro-Wirksamkeit von Fluconazol (Rote Liste Service GmbH, 2017)	22
2.11	In-vitro-Wirksamkeit von Itraconazol (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016b)	23
2.12	In-vitro-Wirksamkeit von Taurolidin (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016a)	25
3.1	Verwendete Substanzen und deren Herstellerfirmen	27
3.2	Inhaltsstoffe der Organbadlösungen physiologische Salzlösung (PSS) und Kalium angereicherte physiologische Salzlösung (KPSS)	28
3.3	Zusammensetzung der Antibiotikamixturen	30
3.4	Erstellung der Konzentrationswirkungskurven (KWK) von ACh	34
3.5	Wirkungsweise der verwendeten Inhibitoren	35
3.6	Inhibitorkombinationen und deren verwendete Konzentration	36
3.7	Gruppeneinteilung für Absorptionsmessungen bei 312 nm	39
3.8	Lagerungszeiten von den Gefäßen in den verschiedenen Probelösungen	40
4.1	Anzahl der verwendeten Arteriensegmente während der Funktionsmessungen	42
4.2	Signifikanzen und Effektstärken der rezeptorunabhängigen Wandspannungsentwicklung	44

4.3	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der rezeptorabhängigen Wandspannungsentwicklung	46
4.4	Signifikante Unterschiede der Wandspannungsentwicklung während der Stimulationsphase (0-10min) mit Noradrenalin	49
4.5	Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die einzelnen Substanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden	51
4.6	Signifikante Unterschiede und Effektstärken in der Wandspannungsentwicklung der Substanzgruppen nach 24 Stunden Lagerungszeit während der Stimulationsphase (0–10min) mit Noradrenalin	53
4.7	Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die Analyse der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Relaxationsantwort	56
4.8	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der endothelabhängigen Relaxationen durch ACh	57
4.9	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der endothelunabhängigen Relaxation durch SNP	58
4.10	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	60
4.11	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweise Konzentrationserhöhung von ACh nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	60
4.12	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	62
4.13	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	63
4.14	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach einer Lagerungszeit von 48h_1Wo in unterschiedlichen Lösungen	64
4.15	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweise Konzentrationserhöhung von SNP bei unterschiedlichen Lagerungszeiten zwischen den unterschiedlichen Lösungen	65
4.16	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	67
4.17	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten SNP Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	68
4.18	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	69
4.19	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach einer Lagerungszeit von 48h_1Wo in unterschiedlichen Lösungen	71
4.20	Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die einzelnen Substanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden	71
4.21	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	73
4.22	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweisen Konzentrationserhöhung von ACh nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	74

4.23	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	75
4.24	Anzahl der verwendeten Arteriensegmente in der jeweiligen Inhibitorgruppe	76
4.25	Signifikante Unterschiede und Effektstärken der Inhibitoren-Gruppe 3	79
4.26	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	80
4.27	Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 1	80
4.28	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	81
4.29	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	82
4.30	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	83
4.31	Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 2	84
4.32	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	85
4.33	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	86
4.34	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2h Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	87
4.35	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	88
4.36	Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 3	88
4.37	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	90
4.38	Ergebnisse der Stabilitätskontrolle der Antibiotika nach 96 Stunden Lagerungszeit	90
4.39	Stabilität von Itraconazol und Gentamicin nach 96 Stunden Lagerungszeit	91
4.40	Anzahl der verwendeten Proben bei den LDH-Messungen	93
4.41	Signifikante Unterschiede und Effektgrößen bei den LDH-Messungen	94
4.42	Übersicht über die Verteilung kardiovaskulären Risikoerkrankungen und die präoperative Medikation in der Patientengruppe (n= 95)	95
B.1	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	135
B.2	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	136
B.3	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	137

B.4	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	138
B.5	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	139
B.6	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	140
B.7	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	141
B.8	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	141
B.9	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	143
B.10	R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen	143

1 Einleitung

Durch den Fortschritt in der Herz-, Gefäß- und Transplantationschirurgie hat die Bedeutung von Gefäßtransplantaten zugenommen. Die Nachfrage an Transplantaten wird durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft und die damit verbundene Zunahme an multimorbiden Patienten zunehmen. Nicht nur bei älteren Patienten kann die Lebensqualität verbessert und die aktive Teilnahme am Alltag ermöglicht werden, sondern die Implantation von Gefäßen kann in allen Altersklassen Leben retten, beispielsweise nach schweren traumatischen Unfällen.

Die Verfügbarkeit von vaskulären Allografts ist jedoch stark limitiert (Aper et al., 2008; DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015). In Deutschland ist die Spende, Prozessierung und Vermittlung von Geweben nicht zentral geregelt. Jede medizinische Einrichtung darf Gewebespenden durchführen, eine eigene Gewebebank führen und Transplantate vermitteln. Voraussetzung sind aufwendige behördliche Genehmigungen (DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015). Durch die Einführung des Gewebegesetzes am 20. Juli 2007 in Europa unterliegt die Entnahme, Prozessierung und Lagerung von Gefäßtransplantaten dem Arzneimittelgesetz. Ziel war die Einführung einheitlicher Qualitäts- und Sicherheitsstandards zum Schutz des Transplantatempfängers (Bundestag, 2007, 2012; DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015). Die Prozessierung der vaskulären Grafts ist sehr aufwendig und kann einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen in Anspruch nehmen. Erst mit dem Nachweis der Unversehrtheit und der fehlenden Kontamination können die Transplantate freigegeben werden (Tabaku et al., 2004; Jashari et al., 2013). Häufig werden während der Prozessierung vaskuläre Allografts in den Gewebebanken in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) gelagert. Diese Lagerungslösung bedingt massive Schädigungen der Gefäße und damit einhergehende Funktionseinschränkungen (Zatschler et al., 2009; Wilbring et al., 2011, 2013). Lange Kaltlagerungszeiten sind dadurch nicht zu realisieren, weshalb die Gefäßtransplantate heutzutage kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung selbst führt wiederum zu Gefäßschäden (Lehle et al., 2006).

Durch die neue Gefäßprotektionslösung Ti Protec[®] können sehr gute Ergebnisse bezüglich der Vitalitätserhaltung und der Funktionalität der Gefäßtransplantate über lange Lagerungszeiten über eine Woche erzielt werden (Zatschler et al., 2009; Garbe, 2011; Wilbring et al., 2011, 2013; Veres et al., 2016). Der Erhalt der Gefäßfunktion spielt eine große Rolle beim Schutz vor Transplantatversagen (Zilla et al., 1993; Vanhoutte et al., 2015; Vanhoutte, 2016). Die Verwendung von antimikrobiellen Dekontaminationslösungen ist nicht einheitlich geregelt, jedoch unterliegen die Etablierung und die Sicherstellung einer vollständigen antimikrobiellen Dekontamination der Gewebe strengen Regelungen (Bundestag, 2007; DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015). Der Fokus der Gewebebanken liegt vor allem auf der Keimfreiheit der Gefäßtransplantate. Einige antimikrobielle Dekontaminationslösungen enthalten beispielsweise das Antimykotikum Amphotericin B, welches nachweislich

stark gewebeschädigend ist (Ebner et al., 2011).

Diese Studie beschäftigt sich mit der Optimierung der Kaltlagerung von humanen Gefäßtransplantaten in Kombination mit verschiedenen antimikrobiellen Dekontaminationslösungen. Es wurden Funktionsmessungen der Gefäße während Kurz- (2 bis 48 Stunden) und Langzeitlagerungen (96 Stunden bis 1 Woche) durchgeführt. Auch die Lagerung der Gefäße über 48 Stunden in einer antimikrobiellen Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung der Gefäßsegmente in frische TiProtec[®]-Lösung wurde evaluiert. Die gesetzlichen Regelungen schreiben eine Mindestzeit von 20 bis 48 Stunden für die antimikrobielle Dekontamination vor (Bundestag, 2007; Jashari et al., 2007; Bisdas & Teebken, 2010). Getestet wurden zwei Antibiotikamixturen und ein Antiseptikum in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Die erste Antibiotikagruppe enthielt Gentamicin, Clindamycin und Flucloxacillin sowie die beiden Antimykotika Fluconazol und Itraconazol. Die Antibiotikagruppe 2 wurde um die antimikrobiellen Substanzen Flucloxacillin und Itraconazol reduziert. Unter Berücksichtigung der Zunahme von multiresistenten Keimen, wurde das Antiseptikum Taurolidin in den Konzentrationen 0,5% und 0,002% gewählt. In der Literatur wird für Taurolidin eine geringe Toxizität angegeben (Schönbeck, 2006; Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a).

Zusätzlich zu den Funktionsmessungen wurden Zytotoxizitätsmessungen der Lagerungslösungen durch Messungen des Konzentrationsanstieges vom Enzym Laktatdehydrogenase durchgeführt. Es wurde auch der Frage nachgegangen, ob die antimikrobiellen Substanzen in der TiProtec[®]-Lösung über eine Langzeitlagerung von 96 Stunden stabil blieben und ob es zur eventuellen Gewebeakkumulation kommen kann.

2 Grundlagen

2.1 Arterien

Arterielle Gefäße führen das Blut vom Herzen weg. Im kleinen Kreislauf (Lungenkreislauf) führen sie sauerstoffarmes, im großen Kreislauf (Körperkreislauf) sauerstoffreiches Blut. Die Wand besteht aus drei konzentrischen Schichten. Die innen gelegene Tunica intima (Intima) besteht aus Endothelzellen, die das Lumen begrenzen. Weitere Bestandteile der Gefäßwand sind eine zarte subendotheliale Bindegewebsschicht und die *Elastica interna*. In der Wandmitte liegt die *Tunica media* (Media), die vor allem aus überwiegend zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen und Bindegewebsfasern besteht. Die außen gelegene *Tunica adventitia* (Adventitia, *Tunica externa*) besteht überwiegend aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen, zahlreichen elastischen Fasern sowie Fibroblasten. Diese Schicht geht ohne scharfe Grenze in das benachbarte lockere Bindegewebe über. An der Grenze zwischen Media und Adventitia ist in vielen Arterien eine weniger klar ausgeprägte *Elastica externa* ausgebildet.

Arterien lassen sich aufgrund von Unterschieden in der Funktion, in der Größe und in der Media in drei großen Gruppen zuordnen. Die großen Arterien vom elastischen Typ (*conducting arteries*) befinden sich herznah. Gefolgt von den muskulären Arterien (*distributing arteries*) und den kleinen Arterien und Arteriolen.

Die elastischen Arterien besitzen zahlreiche mit Lücken versehene Elastinlamellen in ihrer Wand. Ihre Aufgabe besteht darin, das Blut gleichmäßig aus dem Herzen weiterzubefördern, sodass es zu keiner Unterbrechung des Blutflusses kommt (Windkesselfunktion). Das Gewebe der Wand wird in dieser Gefäßgruppe sowohl vom Lumen her ernährt, als auch von eigenen kleinen Gefäßen, die von außen an die Arterienwand herantreten (*Vasa vasorum*).

Die Arterien vom muskulären Typ schließen sich meist ohne scharfe Grenze den Arterien des elastischen Typs an. Sie besitzen eine muskelzellreiche Media und sie machen die Menge der mittelgroßen und kleineren Körperarterien aus. Im Einzelnen herrscht auch hinsichtlich des detaillierten Wandaufbaus bei den Arterien dieses Typs eine deutliche Variabilität, die die lokale physiologische Besonderheiten widerspiegelt und oft eine Beziehung zum Blutdruck erkennen lässt.

Die Arteriolen sind die kleinsten Arterien. Ihre Wand besitzt ein bis zwei geschlossene Muskelschichten. Sie sind funktionell wichtig als Einrichtung der Regulation des peripheren Widerstandes (Widerstandsgefäße) und sie sind besonders reich innerviert (mit Nerven versorgt). Die Muskulatur hat hier eine Sphinkterfunktion, die die Durchblutung der Kapillaren beeinflusst (Welsch, 2009).

Die in dieser Arbeit untersuchte humane *A. mammaria interna*, auch *A. thoracica interna* genannt, gehört

zu den Arterien des elastischen Typs. Charakteristisch sind zahlreiche elastische Lamellen und wenig glatte Muskelzellen in der Gefäßwand (Barry et al., 2003). Die Arterie gehört zu den mittelgroßen Gefäßen und sie besitzt sympathische Nervenfasern in der Adventitia. Altersabhängige Veränderung von Gefäßen wie Arteriosklerose, Intimahyperplasie und Mediaverkalkungen, finden sich an der A. mammaria interna deutlich seltener als an anderen arteriellen Gefäßen ähnlicher Größe. Lediglich die Anzahl an elastischen Fasern nimmt im Alterungsverlauf ab (Reddy et al., 2011). Die A. mammaria interna wird daher als Bypass-Gefäß in der Koronarchirurgie gerne verwendet. Im Vergleich zu anderen in der Bypass-Chirurgie häufig verwendeten Gefäßen wie z.B. V. saphena magna weist sie eine wesentlich bessere Offenheitsrate auf. Diese liegt bei der Arterie nach 10 Jahren noch bei ca. 90%, während die Durchlässigkeit von der Vene bei nur ca. 57% liegt. Deshalb ist sie in der koronaren Bypasschirurgie einer der am besten geeigneten Gefäße zur myokardialen Revaskularisation (Sabik et al., 2005).

2.1.1 Endothelfunktion

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben bildet die Endothelzellschicht die innere Auskleidung der Gefäße. Diese Schicht hat eine Barrierefunktion zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe. Die Kontrolle des Flüssigkeits- und Stoffaustausches zwischen den genannten Räumen gehört ebenso zu den physiologischen Funktionen, wie die Degradation und Synthese von Extrazellulärmatrixbestandteilen. Des Weiteren reguliert das Endothel durch Expression von Oberflächenmolekülen und die Freisetzung von unterschiedlichen Substanzen die inflammatorischen Reaktionen, die Blutgerinnung und die Angiogenese.

Eine weitere wichtige Aufgabe des Endothels ist die Modulation des Gefäßtonus. Dies wird einerseits durch die Metabolisierung von im Blutkreislauf zirkulierenden Stoffen erreicht und andererseits ist das Endothel selbst in der Lage vasoaktive Mediatoren zu synthetisieren und freizusetzen. Dazu gehören vasokonstriktorische und vasodilatatorische Stoffe. Somit spielt das Endothel eine entscheidende Rolle in der Regulation der Gewebedurchblutung (Feletou & Vanhoutte, 2005).

Zu den wichtigen vom Endothel produzierten vasodilatatorischen Stoffen gehört das Stickstoffmonoxid (NO). Erstmals berichteten Furchgott und Zawadzki im Jahre 1980 von einem unbekanntem Stoff, welcher stimuliert durch Acetylcholin eine endothelabhängige Relaxation an isolierten Blutgefäßen bewirkte (Furchgott & Zawadzki, 1980). In späteren Studien wurde diesem Faktor die Bezeichnung EDRF (endothelium-derived relaxing factor) gegeben (Furchgott, 1981). Im Jahre 1987 konnte durch Ignarro und die Arbeitsgruppe um Furchgott bewiesen werden, dass EDRF und NO identisch sind (Ignarro et al., 1987). In weiteren Experimenten konnten drei Hauptgebiete identifiziert werden, in denen NO wichtige Funktionen hat: im kardiovaskulären System, im Nervensystem und bei Entzündungsreaktionen bzw. im immunologischen Bereich (Moncada & Higgs, 2006). NO wird enzymatisch durch L-Arginin gebildet (Moncada et al., 1989). Es sind drei Isoformen der NO-Synthasen bekannt, welche nach den Geweben benannt wurden, in denen sie gefunden wurden (Moncada & Higgs, 2006). Es gibt die nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase), die eNOS (endotheliale NOS) und die iNOS (inducible NOS), welche z.B. in Makrophagen gefunden wurden (Knowles & Moncada, 1994). NO spielt in vielen unterschiedlichen, physiologischen Bereichen eine Rolle, z.B. bewirkt es eine Hemmung der Thrombozytenaggregation

(Azuma et al., 1986) oder es beeinflusst die Zellatmung in Mitochondrien, erhöht die Umsetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und ist damit ein Triggermechanismus für Zellüberleben oder Zelltod (Moncada & Erusalimsky, 2002).

Für die Gefäßfunktion ist die eNOS von herausragender Bedeutung. Die Aminosäure L-Arginin wird mithilfe dieses Enzyms zu NO umgewandelt. Als Nebenprodukt entsteht L-Citrullin (Moncada et al., 1989). Der Botenstoff NO kann nun in benachbarte glatte Muskelzellen der Gefäßwand diffundieren. Dort aktiviert es die lösliche Guanylatzyklase, welche die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert (Waldman & Murad, 1988). Das cGMP kann die Aktivität mehrerer intrazellulärer Proteine beeinflussen. Bei der Vasodilatation vermittelt cGMP über die Proteinkinase G die Absenkung der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins. Diese Vorgänge führen zur Relaxation der glatten Muskelzelle und damit zur druckpassiven Aufdehnung des Gefäßes (Carvajal et al., 2000). Damit nimmt NO eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation ein.

Prostazyklin (Prostaglandin I_2) ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Vasodilatation und wird aus der vierfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure synthetisiert (Moncada & Vane, 1978). Durch die Phospholipase A_2 wird die Arachidonsäure aus Phospholipiden, welche strukturelle Komponenten der Zellmembran sind, gelöst (Ramwell et al., 1977; Cirino, 1998). Durch eine Cyclooxygenase-vermittelte Reaktion (COX 1) werden sogenannte Endoperoxide gebildet. Dieses Enzym hat zwei enzymatische Funktionen. In einem ersten Schritt wird Arachidonsäure zu Prostaglandin G_2 (PGG₂) oxidiert, welches dann im Anschluss durch eine Peroxidase zu Prostaglandin H_2 (PGH₂) umgewandelt wird. Als nächstes katalysiert die Prostazyklinsynthase den Reaktionsschritt von PGH₂ zu Prostazyklin (PGI₂) (Mitchell et al., 2008).

Es gibt zwei Typen von Prostazyklin-Rezeptoren: Einen oberflächlichen- und einen intrazellulären Rezeptor. Beide Arten gibt es sowohl in Gefäßmuskelzellen als auch in Thrombozyten. Der erste Rezeptor ist ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembran-Helices (Stitham et al., 2007). Bei Aktivierung des Rezeptors erfolgt eine G-Protein vermittelte Aktivierung einer Adenylatzyklase (AC). Diese wandelt Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Die Produktion von cAMP bewirkt eine Phosphorylierung vom Enzym Proteinkinase A (PKA). Als letzter Schritt wird dadurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erniedrigt. In Gefäßen wird somit eine Vasodilatation ausgelöst und Thrombozyten werden an ihrer Aggregation gehindert, wodurch es zur Reduktion von Thromben kommt (Schwarz et al., 2001).

Diese Wirkung erzeugt auch der zweite Prostazyklin-Rezeptor. Dieser Rezeptortyp gehört zu einer großen Familie der Peroxisom-Proliferatoraktivierenden Rezeptoren (PPARs). Relevant ist hier der intrazelluläre PPAR β . Die Signalkaskade ist sehr komplex und bewirkt über die Beeinflussung der Gentranskription eine Senkung der intrazelluläre Kalziumkonzentration (Moraes et al., 2006). Somit haben NO und Prostazyklin synergistische Effekte und sind damit kardioprotektive Mediatoren (Mitchell et al., 2008).

Neben NO und Prostazyklin gibt es noch einen weiteren wichtigen endothelabhängigen Vasodilatator. Dieser Faktor heißt Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) und Hinweise auf seine Existenz wurden schon in vielen Blutgefäßen verschiedener Spezies gefunden (Busse et al., 2002). Erstmals

konnte EDHF quantitativ in humanen A. mammaria interna durch die Gruppe Liu et. al nachgewiesen werden (Liu et al., 2000). Weitere Versuche ergaben, dass EDHF sogenannte Epoxyeicosatriensäuren (EET) sind (Busse et al., 2002). In der Literatur werden inzwischen verschiedene Reaktionswege von EET in Endothel- und Muskelzellen diskutiert. EET's sind Metabolite der Cytochrom P450-Familie, welche aus Arachidonsäure von Endothelzellen produziert werden. Durch verschiedene Botenstoffe wie Bradykinin und Acetylcholin sowie durch physikalische Reizungen wie Gewebedehnung und Schubspannung durch den Blutfluss werden diese EET's synthetisiert (Campbell & Fleming, 2010).

Speziell in der humanen A. mammaria interna konnte die Gruppe von Archer et al. experimentell belegen, dass in diesen Gefäßen die 11,12-EET durch das Enzym CYP450-2C synthetisiert wird (Archer et al., 2003). 11,12-EET wirkt über einen Rezeptorkomplex bestehend aus TRPV4 (vanilloid transient receptor potential channel 4), TRPC1 (canonical transient receptor potential channel 1) und K_{Ca} 1.1 (einem Kalzium-sensitiver Kaliumkanal) (Ma et al., 2015). Dieser bewirkt über einen Kalzium-abhängigen Kaliumausstrom eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle und damit eine Relaxation des Gefäßes (Campbell & Fleming, 2010). Werden die anderen endothelabhängigen Vasodilatoren NO und Prostacyclin gehemmt, beträgt die durch EET induzierte Vasodilatation an der A. mammaria interna ca. 40% (Archer et al., 2003). Interessant ist, dass unterschiedliche Arten von Gefäßtypen unterschiedlich gut durch EET und NO relaxieren. Beispielsweise im Vergleich zwischen humanen A. mammaria interna und humanen V. saphena magna. Die basale Freisetzung von EET und NO und die damit verbundene Relaxation des Gefäßes sind in A. mammaria interna stärker. Auch durch Stimulation endogenen freigesetztes NO wirkt länger an der Arterie als in der V. saphena magna. Durch diese protektiven Mechanismen können die höheren Offenheitsraten von A. mammaria interna Bypässe teilweise erklärt werden (Liu et al., 2000).

2.1.2 Funktion der glatten Muskelzellen

Glatte Muskelzellen in der Tunica media besitzen neben der Fähigkeit zur Relaxation (siehe Kapitel 2.1.1) auch die Möglichkeit zur Kontraktion. Damit wird der Strömungswiderstand des Blutes im Körper reguliert. Generell kann eine Vasokonstriktion durch Depolarisation der Zellmembran, mechanische Dehnung und verschiedene neurohumorale Botenstoffe ausgelöst werden (Feletou & Vanhoutte, 2005). Vasokonstriktion erfolgt bei Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration und durch die Kalzium-Sensitivität der glatten Gefäßmuskelzellen.

Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann entweder durch vermehrte Freisetzung von Kalziumionen aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums oder durch Einstrom von extrazellulären Kalziumionen durch membranäre Kalziumkanäle in die glatte Muskelzelle erfolgen (Feletou & Vanhoutte, 2005). Die erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle führt zur Ausbildung eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes. Dieser aktiviert das Enzym Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Die aktivierte MLCK phosphoryliert nun die leichten Ketten des Myosins. Dadurch können die kontraktile Filamente Aktin und Myosin miteinander interagieren. Bei diesem Prozess wird Adenosintriphosphat (ATP) durch eine ATPase des Myosins gespalten (Stull et al., 1991; Hirano et al., 2003). Aktin- und Myosinfilamente können in der Folge ineinander gleiten und zyklische Querbrücken bilden.

Durch diesen Schritt kommt es zur Verkürzung der glatten Muskelzelle. Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration wird hierbei von einer Zunahme der Kalzium-Sensitivität durch Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins unterstützt. Bei erniedrigter Kalziumkonzentration kommt es im Gegenteil zu einer Reduktion von Kalzium-Calmodulinkomplexen und Inaktivierung der MLCK. In dieser Situation bewirkt das Enzym Myosinphosphatase eine Abnahme der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins und damit eine Relaxation der glatten Muskelzelle (Stull et al., 1991). Das Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist sehr komplex und wird neben diesem kalziumabhängigen Signalweg auch durch andere Proteinkinasen reguliert (Hirano et al., 2003). Diese Details würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen und werden deshalb nicht aufgeführt.

2.2 Gefäßtransplantation

2.2.1 Definition und gesetzliche Regelungen

Der Transplantationsbegriff wird wie folgt definiert: "operative Einpflanzung lebender Zellen (einschließlich Bluttransfusion) an eine andere Stelle des gleichen oder in einem anderen Organismus" (Reiche, 2003).

Es wird nach verschiedenen Arten der Verpflanzung unterschieden:

- **Autogen:** an eine andere Stelle des gleichen Organismus
- **Syngen:** bei genetischer Identität von Spender und Empfänger
- **Allogenen:** bei Artengleichheit
- **Xenogen:** bei Artenfremdheit
- **Alloplastisch:** bei Implantation körperfremder Gewebe oder von Aggregaten

Der Gefäßersatz wird definiert als "Ersatz eines geschädigten Blutgefäßes (oder einer Gefäßstrecke) oder von Teilen der Gefäßwand durch ein auto-, allo- oder xenogenes Transplantat oder durch eine alloplastische Gefäßprothese" (Reiche, 2003).

Die grundsätzlichen Regelungen zur Transplantation wurden am 25.06.1997 für den Bereich der Bundesrepublik Deutschland im Transplantationsgesetz festgehalten (Reiche, 2003). Die letzte Änderung erfolgte am 21.07.2012 (Bundestag, 2012). Nach der Erstellung der EU-Geweberichtlinie 2004/23/EG am 31.03.2004, folgte am 20.07.2007 die Veröffentlichung des Gesetzes zur Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebegesetz) und trat am 01.08.2007 in Kraft (Bundestag, 2007). Darin wird definiert, dass Blutgefäße, sofern sie nicht zu einem transplantierten Organ gehören, bzw. für dessen Transplantation notwendig sind, als Gewebe eingeordnet werden. Dadurch fällt die Gewinnung, Verarbeitung und Anwendung unter das Arzneimittelgesetz (Fellmer et al., 2011).

2.2.2 Verwendung von Gefäßtransplantaten in der Klinik

Zur Überbrückung verletzter oder krankhaft veränderter Gefäße (z.B. durch Arteriosklerose oder infizierte Grafts) ist die Verwendung von Ersatzmaterial erforderlich. Heutzutage werden in der Herz- und Gefäßchirurgie autogene, allogene und alloplastische, seltener xenogene Grafts (in diesem Fall meist boviner Herkunft) verwendet (Hach, 2012).

Die experimentellen Grundlagen zur allonenen und xenogenen Gefäßtransplantation erarbeitete Alexis Carrel 1906 (Carrel & Guthrie, 1906). Dafür erhielt er 1912 den Nobelpreis für Medizin (Hach, 2012). Im selben Jahr (1906) gelang es Jose Goyanes in Madrid die V. poplitea zur arteriellen Rekonstruktion eines luetischen Poplitea-Aneurysmas zu verwenden (Goyanes, 1906). Es handelt sich nicht nur um die erste publizierte arterielle Gefäßrekonstruktion durch eine Vene beim Menschen, sondern gleichzeitig auch um den ersten "In-situ-Bypass", da Goyanes die Vene in ihrem Gefäßbett beließ (Hach, 2012). Bis in die 1960er Jahre blieben Homografts das Material der ersten Wahl (Hach, 2012). Problematisch waren damals neben der Beschaffung und der Konservierung der Transplantate, klinische Hinweise auf eine progrediente Gefäßdegeneration nach Transplantation, weshalb zunehmend alloplastischer Gefäßersatz genutzt wurde (Barner & DeWeese, 1967).

Bereits 1543 beschreibt Andreas Vesalius im 7. Buch seiner *Fabrica* die Implantation von Strohhalmen in die Femoralarterien von Hunden (Vesalius, 1543; Hach, 2012). Es wurden über die Jahre verschiedenste letztlich untaugliche Materialien zur Implantation verwendet, welche ohne großen Erfolg blieben. Den Durchbruch alloplastischer Materialien gelang Arthur Voorhees 1952. Er kam auf die Idee textile, poröse Materialien als Gefäßersatz zu verwenden. Nach mehreren Versuchen benutzte er Vinyon, welches aus der ersten vollsynthetischen Spinnfaser (PeCe-Faser) hergestellt wurde (Voorhees, 1952). Im Jahre 1952 konnte Voorhees in einer Notfallsituation bei einem Patienten mit rupturiertem Aortenaneurysma diesen neuen Allograft erfolgreich anwenden (Benvenisty & Voorhees, 1994).

Heute werden im Wesentlichen Polyethylenterephthalat (Polyester, auch bekannt unter dem Handelsnamen Dacron®; klinischer Einsatz seit 1958) und Polytetrafluorethylen (PTFE, Goretex®, als gerecktes ePTFE (e= expandiertem) klinischer Einsatz seit 1975) verwendet (Hach, 2012). Durch die ständige Weiterentwicklung der alloplastischen Grafts trat die Verwendung der Homografts in den Hintergrund. Ein großes Problem der Gefäßchirurgie ist bis heute die mögliche Infektion der Transplantate. Hiervon sind aus unbekanntem Ursachen vor allem alloplastische Grafts betroffen (Szilagyi et al., 1972). In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts empfahl Eduard Kiefer aus Paris, bei Infektion von prothetischen Ersatzmaterial im Bereich der Aorta arterielle Homografts zu verwenden (Kieffer et al., 1993, 2004). Zunehmend werden die unterschiedlichen Grafts in prospektiven Studien am Menschen verglichen. Beispielsweise berichtet die Gruppe von Pupka et al. von sehr guten Ergebnissen bei der Verwendung von arteriellen Homografts oder Silber-beschichteten Polyester-Prothesen bei Ersatz von infizierten Aorten-Grafts (Pupka et al., 2011). Ein anderer Ansatz ist das sogenannte Tissue-Engineering. Hier handelt es sich um ein multidisziplinäres Forschungsgebiet auf dem durch Nutzung von Erkenntnissen zu Materialien und Techniken aus Werkstofftechnik, Ingenieurwissenschaften und Zellbiologie die In-vitro-Erschaffung von künstlichen Geweben bis hin zu autologen implantierbaren Organsystemen angestrebt wird. Das Grundprinzip besteht aus der Isolation und Kultur von Zellen des späteren Empfängers und

deren Ansiedlung auf einer geeigneten Trägerstruktur (Aper et al., 2008). Die Geburtsstunde des Tissue-Engineering sind Versuche von Herring et al. Diese Autoren führten 1978 erstmals die Besiedlung von Dacronprothesen mit Endothelzellen durch (Herring et al., 1978). Die bisherigen Ergebnisse unterschiedlicher Methoden sind noch nicht befriedigend und werden noch weiter verbessert.

Arterien finden als autologes Bypassmaterial ihre standardmäßige Verwendung in der modernen Koronarchirurgie mit der A. mammaria interna und freien Transplantaten der A. radialis, welche bessere Langzeitoffenheitsraten im Vergleich zu Venenbypässen zeigen (Aper et al., 2008). In der Peripherie sind Venenbypässe den synthetischen Prothesen überlegen, weil diese die Eigenschaften eines nativen Blutgefäßes aufweisen. Außerdem wurde belegt, dass sich für kleinlumige Gefäße ($< 5 \text{ mm}$ innerer Durchmesser) im Gegensatz zum alloplastischen Material, vor allem der autologe Gefäßersatz aufgrund besserer Offenheitsraten anbietet (Klinkert et al., 2004; Aper et al., 2008). Grund ist die erhöhte Thrombogenität des körperfremden Materials. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung von Makrophagen, Fibroblasten und des Komplementsystems sowie zur Ausbildung einer Neointima im Lumen des Transplantats. Dadurch kann es zum kurz- oder mittelfristigen Verschluss des Gefäßersatzes kommen (Aper et al., 2008).

Dagegen bieten alloplastische Transplantate folgende Vorteile: Sie sind in Länge und Kaliber wählbar, es entfällt die Notwendigkeit der Venenentnahme, verbunden mit einer deutlichen Verkürzung der Operationszeit und dem Wegfall des Risikos weiterer Wundheilungsstörungen im Bereich der Venenentnahme (Aper et al., 2008).

Prinzipiell sind gefäßchirurgische Patienten häufig multimorbid und es muss für jeden Patienten eine individuelle Therapie interdisziplinär erstellt werden und somit auch entschieden werden, welches Gefäßtransplantat angewendet werden kann.

2.2.3 Konservierungsmethoden

Zurzeit gibt es zwei Methoden, um Gefäße zu lagern mit dem Zweck, den Zeitraum von der Entnahme bis zum Einsetzen des Transplantates zu überbrücken. Zum einen gibt es die Möglichkeit der Kryokonservierung und zum anderen die sogenannte Kaltlagerung bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in verschiedenen Lagerungslösungen. In diesem Kapitel werden diese Methoden näher erläutert. Die Erklärungen zu den verschiedenen Lagerungslösungen finden sich gesondert im Kapitel 2.2.4, Unterkapitel: "Wahl der Protektionslösung".

Die Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) als bundesweites Netzwerk zahlreicher medizinischer Einrichtungen, die im Bereich der Spende und Bearbeitung von Geweben zuständig sind, stellt in sogenannten Gewebebanken kryokonservierte Gefäße zur Verfügung. Die Kryokonservierung kann sowohl für Venen als auch Arterien durchgeführt werden. Die Gefäße stammen in der Regel von Multiorganspendern (Bisdas et al., 2009). Die Gefäße werden nach der Entnahme in Ringer-Lösung bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und einem standardisierten Prozess der DGFG in den Gewebebanken zugeführt. Routinemäßig werden histologische, bakteriologische und virologische Tests an den Spenderallografts vorgenommen. Das Spenderblut wird auf Marker für CMV (Zytomegalievirus), Herpes simplex, HIV, Hepatitis B und C untersucht. Desweiteren werden die Blutgruppen des Spenders und die MHC (Major-

Histokompatibilitätskomplexe) bestimmt, um eine mögliche hohe immunologische Kompatibilität mit dem Empfängerindividuum zu erreichen (Bisdas et al., 2009; Bisdas & Teebken, 2010).

Die Allografts werden in ein Standardkulturmedium (M199) überführt (Bisdas et al., 2009), das ursprünglich als Nährlösung zur Kultivierung von Endothelzellen entwickelt wurde (Hickethier et al., 1999). Dazu wird ein Breitspektrum Antibiotika-Cocktail gegeben (z.B. Meropenem, Colistin, Tobramycin, Vancomycin und Amphotericin B). Die Dekontamination dauert zwischen 24 (Bisdas et al., 2009) und 48 Stunden (Bisdas & Teebken, 2010) bei 4 °C. Im Anschluss daran wird 10% Dimethyl-Sulfoxid hinzugegeben, um eine intrazelluläre Dehydratation während des Gefrierprozesses mit flüssigem Stickstoff zu verhindern (Litvan, 1972). Diese Dehydratation wird bedingt durch die Ausbildung von intrazellulären Eiskristallen, welche schädigend für die Struktur des Zytoplasmas sind (Gournier et al., 1993). Die Gewebetemperatur des Mediums wird in steriler Verpackung computergestützt linear um 1 °C pro Minute auf bis zu -130 °C gesenkt. Anschließend werden die Gewebe in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs bei -190 °C gelagert (Bisdas & Teebken, 2010). Vor der Kryokonservierung testet ein unabhängiger Pathologe in Stichproben, ob das DGFG-Protokoll mit den Standards der American Association of Tissue Banks übereinstimmt (Bisdas et al., 2009). Vor der Implantation wird das Allograft in drei aufeinanderfolgenden Schritten aufgetaut und gewaschen. Dies erfolgt in einer Ringer-Lösung bei 40 °C im Operationssaal (Bisdas et al., 2009).

Bei der Kaltlagerung werden die Gefäßtransplantate bei 4 °C in einer Lagerungslösung gelagert (Alamanni et al., 2002; Galambos et al., 2005; Molnár et al., 2010). Die Wahl der entsprechenden Lösung ist von der jeweiligen Gewebekbank abhängig und bisher wenig standardisiert (Veres et al., 2016). Nähere Erläuterungen finden sich im Kapitel 2.2.4, Unterkapitel: "Wahl der Protektionslösung".

Durch das Inkrafttreten des neuen Gewebegesetzes 2007 und der Festlegung, dass Gewebe unter das Arzneimittelgesetz (AMG) fallen, sind hohe Auflagen zur Umsetzung der Gewinnung, Verarbeitung und Anwendung festgelegt worden. Ziel ist die Verbesserung der Qualitäts- und Sicherheitsstandards in der EU (Fellmer et al., 2011). Bisher waren die Kliniken nicht in der Lage, die hohen Anforderungen des § 20 AMG einzuhalten. Auch die DGFG konnte bisher den Vorgaben nicht gerecht werden. Das hat dazu geführt, dass in Deutschland zurzeit praktisch keine Gefäße zum Zweck der allogenen Transplantation verfügbar sind. Trotz früherer sehr guter Erfahrungen mit frischen (Pupka et al., 2011) oder kalt gelagerten Grafts (Galambos et al., 2005), werden aktuell vor allem kryokonservierte Allografts angeboten (Fellmer et al., 2011).

2.2.4 Schädigungsmechanismen bei Kaltlagerung von Gefäßen

Für die lange Haltbarkeit bzw. Funktionalität und eine gute Offenheitsrate von Gefäßtransplantaten ist ein intaktes Gefäß maßgeblich. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem Endothel zu. Ein funktionstüchtiges Endothel reduziert den Gefäßtonus (peripherer Widerstand), verhindert die Thrombozytenaggregation, verlangsamt die Entstehung von Arteriosklerose und Gefäßmuskelhyperplasie (He, 2005).

Durch geschädigte Gefäße kann es zu Wandrupturen mit Blutungen, Aneurysmabildungen, Bypassverschlüssen z.B. durch Bildung einer Neointima und nachfolgender Ischämie, kommen (Diener et al., 2009)

oder es können sich Fistelgänge zwischen Graft und benachbarten Organen z.B. Duodenum, bilden (Bisdas et al., 2010).

Die Gründe für eine Schädigung des Transplantates sind vielfältig. Es beginnt mit einem mechanischen Trauma während der Entnahme und der anschließenden Spülung der Gefäße. Die Inhaltsstoffe der verschiedenen Lagerungslösungen selbst können schädigend sein. Desweiteren sind die Grafts einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion ausgesetzt. Während der Lagerung können Hypothermieschäden auftreten und auch während der Wiedererwärmung der Transplantate kann es zum Zelluntergang kommen (He, 2005). In den nachfolgenden Unterkapiteln wird auf einige Schädigungsmechanismen näher eingegangen.

Ischämie- und Hypoxieschäden

Nach der Entnahme wird das Transplantat nicht mehr von Blut oder einem anderen sauerstoffhaltigen Medium durchströmt. Dieser Zustand wird als Ischämie bezeichnet. Er hat zur Folge, dass der restliche, noch im Transplantat vorhandene Sauerstoff verbraucht wird und damit ein Sauerstoffmangel eintritt. Dies wird als Hypoxie bezeichnet (de Groot, 1998).

Zellen gewinnen ihre Energie in Form von ATP überwiegend durch oxidative Phosphorylierung im Prozess der Atmungskette in Mitochondrien. Bei Sauerstoffmangel kann diese sehr effektive Form der Produktion des Energieträgers nicht aufrecht erhalten werden (Suleiman et al., 2001). Als alternative Energiegewinnung wird die intrazelluläre, anaerobe Glykolyse stimuliert. Dadurch wird allerdings vermehrt Laktat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet, welches ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes zur Folge hat (Mertens et al., 1990; Suleiman et al., 2001). Obgleich diese Form der Energiebereitstellung weniger vollständig ist, sind gerade Endothelzellen zu einem erheblichen Ausmaß glykolytischer Energiegewinnung fähig (de Groot, 1998).

Dennoch steht der Zelle in dieser Situation weniger ATP zur Verfügung. Dies hat zur Folge, dass die Homöostase der intrazellulären Ionen gestört ist. ATP-abhängige Transporter sind zunehmend nicht mehr in der Lage, das Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Es kommt zu Na^+ - und Ca^{2+} -Akkumulationen in den Zellen (Kupriyanov et al., 1996). Der Kalziumanstieg in der Zelle führt zur Aktivierung der kontraktilen Filamente. Dies löst eine Tonussteigerung aus und führt zur Aktivierung von degenerativen Enzymen, z.B. Proteasen oder Hydrolasen, welche die Zellen schädigen (Suleiman et al., 2001).

Durch den Schädigungsmechanismus der Hypoxie produzieren verschiedene Enzyme in den Endothelzellen sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Mueller et al., 2005). Beispielsweise wird durch Sauerstoffmangel im Komplex I und im Komplex III der Atmungskette in Mitochondrien ROS freigesetzt, wodurch es zur Zellschädigung kommt (Guzy et al., 2005; Murphy, 2009).

Hypothermieschäden

Die Kaltlagerung dient der Verlangsamung aller biochemischer Vorgänge, einschließlich der schädigenden Prozesse (de Groot, 1998). Optimal ist eine Temperatur von 0–4 °C, da in diesen Temperaturberei-

chen nicht die Gefahr der Kristallbildung von Wasser im Gewebe mit einer möglichen Gewebeschädigung auftritt (Erhard, 1998).

Die Hypothermie schützt allerdings nicht nur vor der Schädigung durch Sauerstoff- und Substratmangel, sondern verursacht selbst eine Schädigung (Wille & Rauen, 2010). Eine Schlüsselrolle kommt dem chelatisierbaren, redoxaktiven Eisen zu (Rauen & de Groot, 1998; Rauen et al., 1999; Rauen & de Groot, 2002). Hierbei handelt es sich um eine kleine Fraktion der intrazellulären Eisenionen (0,2–3%). Diese sind durch niedermolekulare Komponenten wie ATP, Phosphat oder Citrat chelatisiert, oder locker an Proteine und Lipide assoziiert (Rauen et al., 2000). Durch Hypothermie steigt der freie Eisenpool schnell an. Durch das Eisen werden niedrig reaktive Sauerstoffspezies in hochaktive Spezies (O_2^- und H_2O_2) überführt (Rauen et al., 2000). Diese reagieren mit Membranlipiden, DNA und anderen intrazellulären Molekülen. In Abhängigkeit der Dauer der Kälteinkubation, kommt es zur Zellschädigung (Rauen et al., 1999).

Vor allem Mitochondrien reagieren sehr empfindlich auf diese Art von Schädigung. Es kommt zur Ausbildung von Poren in der Mitochondrienmembran, wodurch es zu einem gesteigerten Austausch von extra- und intramitochondrialen Stoffen und nachfolgend zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt (Rauen et al., 2003).

Reperfusionsschäden

Bei kritischer Energieversorgung eines Gewebes durch Ischämie und Hypothermie ist zu erwarten, dass es zur Nekrose oder Apoptose kommt, wenn diese Mangelsituation nicht beseitigt wird. Es hat sich aber gezeigt, dass eine notwendige Reperfusion oder Re-Oxygenierung zu einem eigenen Schaden führt, der als Reperfusionsschaden (oder Ischämie-Reperfusionsschaden) bezeichnet wird (de Groot, 1992; Rauen et al., 2000). Dabei handelt es sich um ähnliche Schädigungsmechanismen wie bereits bei der Hypoxie oder Hypothermie beschrieben. Außerdem gelangen aus geschädigten oder abgestorbene Zellen intrazelluläre Proteine in den extrazellulären Raum. Zusammen mit Zelltrümmern wird hierdurch das Komplementsystem aktiviert. Verschiedene Komplementfaktoren aktivieren Granulozyten und Makrophagen. Diese wiederum setzen auch reaktive Sauerstoffspezies frei. Desweiteren werden Proteasen freigesetzt, welche zur weiteren Zellschädigung führen (de Groot, 1998).

Wahl der Protektionslösung

Frühere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Vergleich verschiedener Protektionslösungen, welche in der Klinik aktuell Verwendung finden. Beispiele sind HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung), UW-Lösung (University of Wisconsin-Lösung) und physiologische Kochsalzlösung. Eine für Gefäßtransplantate entwickelte Protektionslösung namens TiProtec[®] wurde in dieser Arbeit detaillierter untersucht. In verschiedenen Studien konnte für diese Lagerungslösung eine gute Protektion des Endothels nachgewiesen werden (Wille, 2010; Garbe, 2011; Veres et al., 2016). Zur optimalen Kaltlagerung von Blutgefäßen sind die genannten Organkonservierungslösungen weniger geeignet (Wille, 2010; Garbe, 2011).

Tab. 2.1: Zusammensetzung verschiedener Protektionslösungen

Substanz	TiProtec [®]	HTK	UW	NaCl
α – Ketoglutarat	2	1	–	–
Aspartat	5	–	–	–
Lactobionat	–	–	100	–
Histidin	–	198	–	–
N – Acetylhistidin	30	–	–	–
Glycin	10	–	–	–
Alanin	5	–	–	–
Tryptophan	2	2	–	–
Saccharose	20	–	–	–
Glucose	10	–	–	–
Raffinose	–	–	30	–
Mannitol	–	30	–	–
Cl ⁻	103,1	50	–	154
H ₂ PO ₄ ⁻	1	–	25	–
SO ₄ ²⁻	–	–	5	–
Na ⁺	16	15	25	154
K ⁺	93	10	125	–
Mg ²⁺	8	4	5	–
Ca ²⁺	0,05	0,015	–	–
HAES	–	–	50 g/l	–
Allopurinol	–	–	1	–
Adenosin	–	–	5	–
GSH	–	–	3	–
Insulin	–	–	40 U/l	–
Dexamethason	–	–	16 mg/l	–
Penicillin	–	–	2 * 10 ⁵ U/l	–
Deferoxamin	0,082	–	–	–
LK 614	0,017	–	–	–
pH – Wert	7,0	7,2	7,4	6,0
Osmolarität	305	310	320	308

Alle Substanzen sind in *mmol/l* und die Osmolarität ist in *mosmol/l* angegeben

Grundsätzlich gibt es verschiedene protektive Prinzipien, welche von Belzer und Southard beschrieben wurden (Belzer & Southard, 1988):

- Verhinderung einer intrazellulären Azidose mittels potenter Puffersysteme
- Prävention eines interstitiellen Ödems durch onkotisch wirksame Substanzen
- Zugabe von Antioxidanzien zum Schutz vor ROS-induzierten Zellschäden
- Bereitstellung von Substraten zur Regeneration energiereicher Phosphate

Zur Optimierung der Kaltlagerung von Gefäßen wurden umfangreiche Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Rauen und Herrn Dr. Wille (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt (Wille et al., 2008).

Untersucht wurden die Endothelvitalität, das mitochondriale Membranpotential und die Thrombozytenadhäsion. Bei der TiProtec[®]-Lösung sind folgende Komponenten zur Zellprotektion hervorzuheben:

- Durch die Ischämie kommt es zur verstärkten anaeroben Glykolyse und damit zur exzessiven Laktatbildung. Als Puffersystem für die intrazelluläre Azidose dient hier das N-Acetylhistidin. Ein leicht erniedrigter pH-Wert wirkt sich allerdings protektiv aus.
- Hohe Konzentrationen von Kalium (Hauptkation) und Chlorid (Hauptanion).
- Als Eisenchelatoren Desferal und LK 614, wodurch die Bildung von Sauerstoffradikalen reduziert werden soll.
- Zur Energiegewinnung dient α -Ketoglutarat, Aspartat und Glucose.
- Um die Bildung unspezifischer Membranporen als Folge der verminderten Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase bei Hypoxie mit nachfolgenden Natrium- und Wassereinstrom zu verhindern (Belzer & Southard, 1988), wurden Glycin, Alanin und Tryptophan hinzugefügt. Dadurch wird eine Ödembildung der Zellen vermindert. Dies wird durch eine geringfügig erhöhte Osmolarität unterstützt.

Eine neue Studie (Veres et al., 2016) zeigt, dass TiProtec[®] im Vergleich zu anderen Lagerungslösungen wie NaCl und Custodiol eine höhere eNOS-Expression bewirkt. Außerdem werden Signalwege der Apoptose unterdrückt. Auch kam es in der Aortenwand von Ratten (Intima und Media) zu weniger DNA-Strangbrüchen als in den Vergleichslösungen. Insgesamt reduziert TiProtec[®] endotheliale Dysfunktion, schützt die glattmuskulären Zellen der Media vor degenerativen Veränderungen und verbessert histopathologische Veränderungen (Veres et al., 2016).

2.2.5 Verwendung antimikrobiellen Dekontaminationsstoffen

Wie bereits im Kapitel 2.2.1 beschrieben unterliegt die Gewinnung, Prozessierung und Anwendung eines Gewebes dem Arzneimittelgesetz, welches im Gewebegesetz definiert ist (Bundestag, 2007). Maßgeblich für die Effektivität der Dekontamination und die Qualität des Gewebes ist der von der jeweiligen Gewebebank verwendete Antibiotikacocktail. Die Daten müssen der entsprechenden Landesbehörde offengelegt werden (Bisdas & Teebken, 2010). Außerdem benötigen die Gewebebanken eine Zulassung

der Bundesoberbehörde, um Gewebezubereitungen in den Verkehr zu bringen. Die Genehmigung erteilt das Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, das Paul-Ehrlich-Institut (DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015).

Die Literaturrecherche ergab, dass es keine einheitlichen Regelungen für die Dekontamination von Geweben bei den deutschen und europäischen Gewebebanken gibt. Welche Gewebebank welche antimikrobielle Lösung verwendet, ist keine öffentliche Information (Bisdas & Teebken, 2010). Dies wurde von der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) Hannover auch noch einmal bestätigt (Diplom-Biologin Ilka Wittmershaus, Zentrales QM, DGFG Hannover, persönliche Mitteilung). Vereinzelt sind einige Antibiotikacocktails publiziert worden. Beispielsweise hat die European homograft bank (EHB) in Brüssel ihre 14-jährigen Erfahrungen zur Etablierung von Gewebeprozessierungen offen gelegt (Jashari et al., 2004). In der nachfolgenden Tabelle sind einige Beispiele von Dekontaminationslösungen dargestellt.

Tab. 2.2: Beispiele für publizierte Dekontaminationslösungen

EHB (Jashari et al., 2004, 2007)	<ul style="list-style-type: none">• Lincomycin• Polymyxin B• Vancomycin
J.P. Leeming; R.J. Lomas (Leeming et al., 2005; Lomas et al., 2013) ("Cambridge cocktail")	<ul style="list-style-type: none">• Gentamicin• Imipenem• Nystatin• Polymyxin B• Vancomycin
J.P. Leeming (Leeming et al., 2005) ("Bristol cocktail")	<ul style="list-style-type: none">• Gentamicin• Ciprofloxacin• Amphotericin B• Vancomycin
T. Bisdas (Bisdas & Teebken, 2010)	<ul style="list-style-type: none">• Meropenem• Colistin• Tobramycin• Amphotericin B• Vancomycin

2.2.6 Eigenschaften der verwendeten antimikrobiellen Stoffe

Ziel dieser Arbeit ist die Prüfung, welche antimikrobiellen Stoffe, die das Keimspektrum von Gefäßtransplantaten abdecken, die Vitalität der Gefäße während der Lagerung und Dekontamination erhalten. Beispielsweise wird in der hier geprüften Dekontaminationslösung kein Amphotericin B verwendet, weil die publizierten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe dessen Toxizität bereits nachgewiesen haben (Ebner et al., 2011). Auch die EHB hat dieses Antimykotikum aus Ihrer Lösung entfernt (Jashari et al., 2007). In den folgenden Unterkapiteln wird im Detail auf die in dieser Dekontaminationslösung verwendeten Substanzen eingegangen. Die Tabellen stellen nur die üblicherweise empfindlichen Mikroorganismen dar und nicht die Spezies bei denen erworbene Resistenzen ein Problem darstellen könnten. Die Prävalenz der erworbenen Resistenzen ist meist geographisch und zeitlich variabel. Die European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) legt Grenzwerte für die verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen fest (Rote Liste Service GmbH, 2014).

Das nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) hat seit ca. 20 Jahren ein deutschlandweit einheitliches Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) etabliert. Ziel ist die Reduktion von nosokomialen Infektionen (Breier et al., 2016). An Untersuchungsmaterial der EHB wurden bei circa 27% der Gefäßtransplantate verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen (Jashari et al., 2007). Eine Übersicht bietet nachfolgende Tabelle.

Tab. 2.3: Anteil der häufigsten nachgewiesenen Erreger [%] bei postoperativen Wundinfektionen je nach Fachgebiet. (Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2012)

Erreger	Herzchirurgie	Gefäßchirurgie
<i>S. aureus</i>	28,3	37,8
MRSA	18,7	27,1
<i>Enterococcus</i> spp.	8,4	18,6
<i>E. coli</i>	4,8	10,8
<i>P. aeruginosa</i>	3,1	7,6
<i>Klebsiella</i> spp.	2,4	2,5
Koagulasenegative Staphylokokken	19,6	7,0
<i>Enterobacter</i> spp.	5,1	4,7
<i>Streptococcus</i> spp.	0,5	0,7

Neben bakteriellen- werden auch Pilzkontaminationen nachgewiesen. Die Häufigkeit von Pilzinfektionen nimmt in der Gefäßchirurgie weiter zu (Wagner, 2000). Im Vergleich zu den bakteriellen Infektionen ist die Häufigkeit allerdings prozentual niedriger. Ein großes Problem stellen die systemischen Pilzinfektionen dar, welche sehr gefürchtet sind und letal enden können. Am Häufigsten ist mit 60 – 90% *Candida albicans* vertreten. Auch *Aspergillus*-Spezies sind häufig (Wagner, 2000). Durch längere Antibiotikatherapien haben Pilze einen relativen Standortvorteil, wodurch sie sich mehr als physiologisch vermehren

(Wagner, 2000). Eine Arbeit von Ali et al. zeigt einen tabellarischen Überblick über Pilzinfektionen in Gefäßtransplantaten von 1990 bis 2006 (Ali et al., 2009).

Tab. 2.4: Langzeitergebnisse von Erregern in Gefäßtransplantaten (1990-2006) (Ali et al., 2009)

Mikrobiologie	Erregeranzahl
Kein Wachstum	31 (17%)
Einzelorganismen	81 (45%)
Multiple Organismen	67 (37%)
Keine Daten vorhanden	7 (4%)
Vorhandene Daten	180 (96%)
Klassifikation Erreger	
Gram positive	100 (55%)
Gram negative	57 (32%)
Anaerob	24 (13%)
Pilzartige	32 (18%)

Gentamicin

Aus der Fachinformation der Roten Liste ist zu entnehmen, dass es sich bei Gentamicin um ein Aminoglykosid-Antibiotikum handelt (Rote Liste Service GmbH, 2014). Ursprünglich wurde es aus *Mircromonospora purpurea* gewonnen (Rote Liste Service GmbH, 2014). Die gebräuchliche Form der Substanz ist das Gentamicinsulfat. Es stellt ein Gemisch aus strukturell sehr ähnlichen Homologen dar: C_1 , C_2 und C_{1a} (Weinstein et al., 1967).

Gentamicin hat eine bakterizide Wirkung sowohl im Proliferations- als auch Ruhestadium der Bakterien (Rote Liste Service GmbH, 2014). Das Antibiotikum bewirkt eine Hemmung der Proteinsynthese durch Anlagerung an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms (Kadurugamuwa et al., 1993). Es kommt zum "Misreading" der m-RNA-Information (Rote Liste Service GmbH, 2014).

Die antibakterielle Wirkung von Gentamicin ist konzentrationsabhängig. Aminoglykoside weisen einen postantibiotischen Effekt auf. Das heißt, dass bei ausreichend hoher Dosierung dieses Antibiotikum gegen viele empfindliche Mikroorganismen wirksam ist, auch wenn die Konzentration in Plasma oder Körpergewebe während des Dosierungsintervalls teilweise unter der minimale Hemmkonzentration (MHK) bleibt (Buxbaum & Georgopoulos, 1996).

Schon in früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass Gentamicin keinen zytotoxischen Effekt auf Zellkulturen von Säugetieren hat (Rudin et al., 1970). Beim Menschen sind die Hauptnebenwirkungen ototoxische und/oder nephrotoxische Wirkungen. Des Weiteren sind Wechselwirkungen mit Muskelrelaxantien vom nicht-depolarisierenden Typ bekannt. Die neuromuskuläre Blockade kann verstärkt und verlängert sein (Rote Liste Service GmbH, 2014).

Für Gentamicin sind verschiedene synergistische Wirkungen mit Beta-Lactamen gegen Gram-positive Kokken, mit Acylamino-Penicillinen auf *Pseudomonas aeruginosa* und mit Cephalosporinen auf *Klebsiella pneumonia* beschrieben (Rudin et al., 1970; White et al., 1979; Rote Liste Service GmbH, 2014).

Die nachfolgende Tabelle stellt einen Auszug über empfindliche Spezies gegenüber Gentamicin in Deutschland dar.

Tab. 2.5: Ergebnisse über empfindliche Mikroorganismen (M) gegenüber Gentamicin (Rote Liste Service GmbH, 2014)

Aerobe Gram-negative M.	Aerobe Gram-positive M.
• <i>Citrobacter freundii</i>	• <i>Staphylococcus aureus</i>
• <i>Enterobacter aerogenes</i> °	• <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-sensibel)
• <i>Enterobacter cloacae</i>	• <i>Staphylococcus saprophyticus</i> °
• <i>Escherichia coli</i> #	
• <i>Klebsiella oxytoca</i>	
• <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
• <i>Proteus vulgaris</i>	
• <i>Salmonella enterica</i>	
• <i>Serratia liquefaciens</i> °	
• <i>Serratia marcescens</i>	

° Bei Veröffentlichung der Tabelle lagen keine aktuellen Daten vor. In der Primärliteratur, Standardwerken und Therapieempfehlungen wird von einer Empfindlichkeit ausgegangen.

Auf Intensivstationen liegt die Resistenzrate bei $\geq 10\%$.

Clindamycin

Clindamycin ist ein chloriertes Derivat von Lincomycin und wird halbsynthetisch hergestellt (Magerlein et al., 1966). Lincomycin wurde ursprünglich aus *Streptomyces lincolnensis* isoliert (Lewis et al., 1963). Eine Studie zeigt, dass beide Substanzen das gleiche bakterielle Spektrum in vivo und in vitro aufweisen (Leigh, 1981). Clindamycin hat eine überwiegend bakteriostatische Wirkung. Die Substanz hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50 S-Untereinheit (Douthwaite, 1992). Clindamycin hemmt außerdem effektiv die Bildung von Exotoxinen, welche von *Staphylokokkus aureus* und Streptokokken gebildet werden. In der Klinik kann dadurch das Risiko an einem durch bakterielle Exotoxine ausgelösten Toxic-Schock-Syndrom zu erkranken, reduziert werden (Van Langevelde et al., 1997).

Die Wirksamkeit hängt vor allem von der Zeitdauer ab, während der Wirkstoffspiegel oberhalb der MHK des Erregers liegt (Rote Liste Service GmbH, 2016). Wie Gentamicin besitzt Clindamycin neuromuskulär-blockierende Eigenschaften und kann deshalb die Wirkung von Muskelrelaxantien verstärken (Rote Liste Service GmbH, 2016).

Es sind Wechselwirkungen mit Vitamin-K-Antagonisten, z.B. Warfarin, beschrieben worden. Die Pati-

enten hatten veränderte Blutgerinnungswerte und/oder es kam zu Blutungen (Aldous & Olson, 2001). Des Weiteren sollte Clindamycin nicht mit Erythromycin kombiniert werden, da hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung in vitro ein antagonistischer Effekt beobachtet wurde (Rote Liste Service GmbH, 2016).

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine aktuelle Übersicht von der EUCAST über die Clindamycin empfindlichen Spezies in Europa.

Tab. 2.6: Ergebnisse über empfindliche Mikroorganismen (M) gegenüber Clindamycin (Rote Liste Service GmbH, 2016)

Aerobe Gram-positive M.	Anaerobe M.	Andere M.
• Actinomyces israelii °	• Bacteroides spp. ° (außer B. fragilis)	• Chlamydia trachomatis °
• Staphylococcus aureus (Methicillin-sensibel)	• Fusobacterium spp. °	• Chlamydia pneumoniae °
• Streptococcus agalactiae	• Peptococcus spp. °	• Gardnerella vaginalis °
• Streptokokken der "Viridans-Gruppe" ^	• Prevotella spp.	• Mycoplasma hominis °
	• Veillonella spp. °	

° Bei Veröffentlichung der Tabelle lagen keine aktuellen Daten vor. In der Primärliteratur, Standardwerken und Therapieempfehlungen wird von einer Empfindlichkeit ausgegangen.

^ Sammelbezeichnung für eine heterogene Gruppe von Streptokokken-Spezies. Die Resistenzrate kann in Abhängigkeit von der vorliegenden Streptokokken-Spezies variieren.

Metronidazol

Metronidazol gehört zu der Gruppe der Nitroimidazole. Es gelangt als Prodrug über passive Diffusion in die Zelle. Die eigentliche Aktivierung erfolgt im Zytoplasma. Alle Antibiotika dieser Gruppe verfügen über eine Nitrogruppe. Durch Reduktion dieser Gruppe entsteht ein kurzlebige freies Radikal. Dieses bindet unspezifisch an die bakterielle DNA. Es kommt zu Strangbrüchen und zur Destabilisierung der Helix. Somit kommt es zum Zelltod, jedoch nicht zur Zelllyse (Land & Johnson, 1999; Diniz et al., 2000; Lofmark et al., 2010; Funke, 2014). Metronidazol wirkt vor allem gegen anaerobe Bakterien und Protozoen. Die Substanz ist seit über 45 Jahren auf dem Markt und die Resistenzlage ist nach wie vor sehr gering (Lofmark et al., 2010). Beispielsweise gegenüber Bacteroides fragilis liegt die Resistenzrate in Europa < 1% (Hedberg et al., 2003). Dennoch wurden verschiedene Resistenzmechanismen publiziert. Interessant ist das Vorhandensein von sogenannten Nim-Genen (Nitroimidazole resistance gene) im Bakteriengenom. Diese kodieren für eine alternative Reduktase, welche Nitroimidazole in eine nichttoxische Form umwandeln kann. Zurzeit sind sieben verschiedene Nim-Gene (NimA-NimG) bekannt (Lofmark et al., 2005; Schaumann et al., 2005).

Die Hauptnebenwirkungen beim Menschen sind eine moderate Leukopenie und andere Störungen der Blutbildung/Zusammensetzung. Selten kommt es durch intensivere und/oder verlängerte Therapie zur

Pankreatitis, peripheren Neuropathie oder epilepsieartigen Krampfanfällen. Diese Symptome sind reversibel (Rote Liste Service GmbH, 2013). Die Rote Liste hat für Metronidazol eine Liste mit Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln/Substanzen veröffentlicht. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten Interaktionen.

Tab. 2.7: Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln oder sonstigen Substanzen (Rote Liste Service GmbH, 2013)

Arzneimittel / Substanz	Wechselwirkung
Alkohol	Unverträglichkeitsstörungen: z. B. Hautrötungen, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindel
Disulfiram	Ähnlich wie Alkohol, zusätzlich Verwirrheitszustände und Psychosen
Barbiturate und Phenytoin	Wirkungsverminderung von Metronidazol
Cimetidin	Kann die Elimination von Metronidazol beeinträchtigen
Antikoagulantien (Warfarin-Typ)	Die blutgerinnungshemmende Wirkung kann verstärkt sein
Lithium-Salze	Es kann zur Akkumulation von Lithium im Serum kommen
Vecuronium	Die Wirkung von nicht-depolarisierenden Curaremimetika kann sich potenzieren
5-Fluorouracil	Erhöhte Toxizität wegen verringerter Clearance
Cholestyramin	Die Resorption von Metronidazol kann sich verzögern/ verringern
Ciclosporin	Es kann zu erhöhten Ciclosporin-Serumwerten kommen
Busulfan	Es kann zu erhöhten Plasmaspiegeln von Busulfan kommen

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über empfindliche Erreger gegenüber Metronidazol aus der Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz:

Tab. 2.8: In-vitro-Wirksamkeit von Metronidazol (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2017b)

Gram-negative obligate Anaerobier	Gram-positive obligate Anaerobier	Protozoen
<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Bacteroides</i> spp. inkl. <i>B. fragilis</i> und <i>melaninogenicus</i> ● <i>Fusobacterium</i> spp. ● <i>Veillonella</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Clostridium</i> spp. inkl. <i>C. perfringens</i> ● <i>Eubacterium</i> spp. ● <i>Peptococcus</i> spp. ● <i>Peptostreptococcus</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Trichomonas vaginalis</i> ● <i>Entamoeba histolytica</i> ● <i>Balantidium coli</i> ● <i>Giardia lamblia</i>

Flucloxacillin

Flucloxacillin ist ein bakterizid wirkendes Penicillinase-festes Isoxazolympenicillin. Angriffspunkt ist die bakterielle Zellwand. Durch die Bindung an die Transpeptidasen wird die Quervernetzung von Zellwandstrukturen gehemmt. Dadurch resultiert eine Instabilität und führt über die Lyse zum Zelltod (Sutherland et al., 1970; Rote Liste Service GmbH, 2011). Eine wichtige Gegenanzeige für Flucloxacillin sind Kreuzallergien mit Betalaktam-Antibiotika. Vor allem die parenterale Gabe kann zu einem lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock führen (Baldo et al., 1995; Rote Liste Service GmbH, 2011). Eine weitere gefürchtete Nebenwirkung ist eine durch Flucloxacillin ausgelöste cholestatische Hepatitis (Olsson et al., 1992).

Interessant ist, dass die Kombination von Flucloxacillin und Gentamicin die Bildung von bakteriellen Exotoxinen durch *Staphylococcus aureus* oder Streptokokken effektiv hemmt. Diese Wirkung wurde bereits im Kapitel über Clindamycin beschrieben (Van Langevelde et al., 1997). Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über empfindliche Spezies.

Tab. 2.9: In vitro-Aktivitätsspektrum von Flucloxacillin (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2017a)

Gram-positive Mikroorganismen	Gram-negative Mikroorganismen
• <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-sensibel)	• <i>Neisseria meningitidis</i>
• <i>Staphylococcus epidermidis</i>	• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
• <i>Streptococcus pyogenes</i>	
• <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
• <i>Streptococcus viridans</i>	
• <i>Bacillus anthracis</i>	
• <i>Clostridium tetani</i>	
• <i>Clostridium welchii</i>	

Fluconazol

Fluconazol ist ein Triazol-Derivat und gehört der pharmakotherapeutischen Gruppe der Antimykotika an. Dieses Triazol wird in der Literatur als hydrophil und metabolisch stabil angegeben (Pittrow & Penk, 1996).

Ergosterol ist in Pilzen für die normale Funktion der Zellmembran essentiell. Der primäre Wirkmechanismus von Fluconazol bzw. Azole beruht auf der Hemmung der Cytochrom-P450-vermittelten 14-alpha-Lanosterol-Demethylierung. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Ergosterol-Biosynthese (Hitchock, 1991; Van den Bossche et al., 1994). Einerseits beruht die Wirkung von Azolen in der Verarmung an Ergosterol und andererseits in der Toxizität der angereicherten Ergosterol-Vorstufen (Ghannoum & Rice, 1999; Hummel-Kemmer, 2005). Bei den Vorstufen handelt es sich um 14-alpha-Methyl-Sterolen

(Hitchcock, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Fluconazol eine höhere Selektivität für Cytochrom-P450-Enzymsysteme von Pilzen als für verschiedene Cytochrom-P450-Enzymsysteme bei Säugetieren hat (Rote Liste Service GmbH, 2017).

Fluconazol ist im Menschen ein CYP2C9-, CYP2C19- und ein CYP3A4-Inhibitor. Dies bewirkt, dass viele Substanzen/Medikamente langsamer von der Leber metabolisiert werden und es zur Akkumulation der Wirkstoffe im Körper kommen kann. Deshalb wird beispielsweise die gleichzeitige Anwendung von Medikamenten, welche zu Herzrhythmusstörungen führen (Verlängerung des QTc-Intervalls und zu Torsade de pointes) nicht empfohlen bzw. sind kontraindiziert (Niwa et al., 2005; Rote Liste Service GmbH, 2017). Fluconazol ist gegen viele Candida-Spezies wirksam, außer *Candida krusei* (Orozco et al., 1998). Die nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick über die antimykotische Wirksamkeit.

Tab. 2.10: In-vitro-Wirksamkeit von Fluconazol (Rote Liste Service GmbH, 2017)

Candida-Spezies	Andere Pilzstämme
• <i>C. albicans</i>	• <i>Cryptococcus neoformans</i>
• <i>C. parapsilosis</i>	• <i>Cryptococcus gattii</i>
• <i>C. glabrata</i>	• <i>Blastomyces dermatitidis</i>
• <i>C. tropicalis</i>	• <i>Coccidioides immitis</i>
	• <i>Histoplasma capsulatum</i>
	• <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

Itraconazol

Itraconazol gehört auch zu der Gruppe der Triazole. Als Azol besitzt es die gleichen Wirkmechanismen wie Fluconazol. Jedoch wird es im Gegensatz zu Fluconazol als lipophil und metabolisch instabil beschrieben (Pittrow & Penk, 1996).

Dieses Antimykotikum ist allerdings ein stärkerer CYP3A4-Inhibitor und hemmt weniger die Enzyme CYP2C9 und CYP2C19 (Isoherranen et al., 2004; Niwa et al., 2005). Deshalb ist die Liste der Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten mehr auf die CYP3A4-Enzyminhibition fokussiert. Trotzdem werden auch hier kardiale Nebenwirkungen wie bei Fluconazol beobachtet (Rote Liste Service GmbH, 2015). Interessant ist, dass Itraconazol eine etwas bessere Wirkung gegen Aspergillen und zum Teil auch Wirkung gegen Fluconazol-resistente Candida-Stämme hat (Hummel-Kemmer, 2005). Nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick über Itraconazol empfindliche Spezies.

Tab. 2.11: In-vitro-Wirksamkeit von Itraconazol (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016b)

Candida-Spezies	Andere Pilzstämme
• <i>C. krusei</i>	• <i>Cryptococcus neoformans</i>
• <i>C. albicans</i>	• <i>Pityrosporum pachydermatis</i>
• <i>C. parapsilosis</i>	• <i>Pityrosporum ovale</i>
• <i>C. glabrata</i>	• <i>Aspergillus fumigatus</i>
• <i>C. tropicalis</i>	• Andere <i>Aspergillus</i> spp. (außer <i>A. niger</i>)
	• <i>Dermatiaceae</i> ¹
	• <i>Absida corymbifera</i>
	• <i>Pseudoallescheria boydii</i>
	• <i>Trichosporon beidelii</i>
	• <i>Blastomyces dermatitidis</i>
	• <i>Histoplasma capsulatum</i>
	• <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	• <i>Sporothrix schenckii</i>
	• <i>Chromoblastomykosen</i> ²
	• <i>Epidermophyton floccosum</i>
	• <i>Microsporum</i> spp.
	• <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	• <i>Trichophyton rubrum</i>
	• Andere <i>Trichophyton</i> spp.

¹ *Exophiala jeanselmei*, *Cladosporium* spp., *Phaeoannellomyces werneckii*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium solani*, *Curvularia* spp., *Piedraia hortae*, *Bipolaris hawaiiensis*.

² *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea* spp., *Phialophora verrucosa*.

Taurolidin

Taurolidin (4,4'-Methylen-bis[tetrahydro-1,2,4-thiadiazin-1,1-dioxid]1) ist ein synthetisch hergestelltes weißes kristallines Pulver, welches antiseptisch wirkt (Stendel, 2006). In wässriger Lösung liegt die Substanz im Gleichgewicht mit N-Hydroxymethyl-Taurultam und Taurultam vor (Knight et al., 1983; Sihm et al., 1997). Taurultam wird zu Hydroxymethyl-Taurinamid und schließlich zu Taurin metabolisiert (siehe Abbildung 2.1) (Knight et al., 1981; Stendel, 2006).

Taurolidin wirkt antimikrobiell über seine Hydroxymethylgruppen (auch Methylol-Gruppen genannt). Während des Metabolismus liegen Hydroxymethyl-Taurultam und Hydroxymethyl-Taurinamid im Gleich-

gewicht vor oder sie entstehen durch enzymatische Hydrolyse (Erb et al., 1982; Stendel, 2006). Durch Hydrolyse entstehen drei sogenannte Hydroxymethyl-Taurinamide (Pfirrmann, 1985).

Die Hydroxymethylgruppen reagieren mit den freien Aminogruppen der Mureine der Bakterienzellwand und vieler Pilze (Pfirrmann, 1985; Stendel, 2006). Interessant ist, dass sich durch eine Temperaturerhöhung auf 37 °C die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht und damit die Abtötungszeit verkürzt wird (Pfirrmann, 1985). Außerdem kann in-vitro durch Zugabe von frischem Serum die MHK um das 4- bis 8-Fache reduziert werden (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a).

Des Weiteren bewirkt Taurolidin bereits in geringen Konzentrationen einen Verlust der Fimbrien und Flagellen von Bakterien. Die Fähigkeit zur Koloniebildung geht damit verloren, weil sich die Oberfläche der Bakterien verändert. Dadurch wird eine Anhaftung von Bakterien an Oberflächen von Epithelien und Biomaterialien verhindert. Somit wirken diese antiadhärenten Eigenschaften von Taurolidin einer Biofilmbildung entgegen (Caruso et al., 2010).

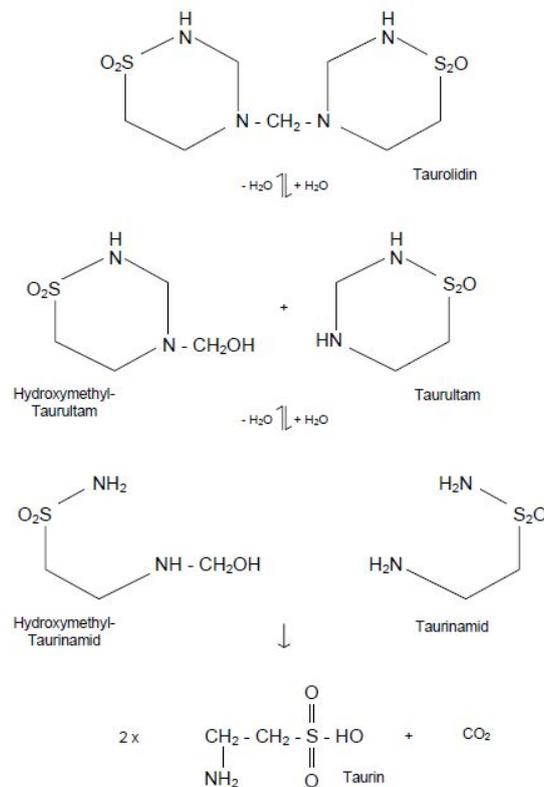


Abb. 2.1: Pharmakokinetik von Taurolidin (Stendel, 2006)

Taurolidin ist gegen viele grampositive-, gramnegative Bakterien und gegen Pilze antimikrobiell wirksam. Dies betrifft auch die nosokomialen und häufig gegen andere Antibiotika resistente Problemkeime, wie MRSA, VRSA, VRE und Pseudomonas aeruginosa (Torres-Viera et al., 2000). Taurolidin wirkt auf gramnegative Keime ohne Freisetzung von Endotoxinen. Zudem erfolgt durch die chemische Reaktion von Taurolidin mit NH₂-Gruppen der Exo- oder Endotoxine eine Inaktivierung dieser Zellbestandteile. Durch diese Reaktion und die direkte Interaktion mit der Zellwand wird eine Resistenzentwicklung verhindert (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a). Nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick zur in-vitro-Wirksamkeit von Taurolidin.

Tab. 2.12: In-vitro-Wirksamkeit von Taurolidin (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016a)

Aerobe Bakterien	Anaerobe Bakterien	Fungi
• Streptokokken (Gruppe A-D)	• Bacteroides fragilis	• Candida albicans
• Staphylococcus aureus	• Bacteroides vulgatus	• Aspergillus fumigatus
• Koagulase-negative Staphylokokken	• Bacteroides distarsonis	• Aspergillus niger
• Pneumokokken	• Peptostreptococcus anaerobicus	• Trichophyton
• Enterobakterien ¹	• Clostridien-Arten	• Cryptococcus neoformans
• Pseudomonas aeruginosa		• Epidermophyton
• Pseudomonas cepacia		
• Salmonella typh./enteritidis		
• Shigella flexneri/sonnei		

¹ einschließlich E. coli, Klebsiella aeruginosa, Serratia- und Proteus-Arten

Nach aktueller Datenlage weist Taurolidin nur eine geringe Toxizität auf. Eine zu rasche i.v. Infusion kann zu kurzfristigen vagotonen Nebenwirkungen führen, die sich durch Atropin wieder aufheben lassen (Schönbeck, 2006; Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016a). In der Klinik wird Taurolidin zur intraoperativen Spülung der Bauchhöhle, über i.v.-Gaben oder über Drainagen verabreicht. Anwendungsgebiete sind Peritonitis, Pleuraempyem, Weichteil- und Knochenverletzungen (Pfirrmann, 1985; Staubach, 1997; Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016a). Kontraindikationen sind Allergie/Überempfindlichkeit und terminale Niereninsuffizienz. Weiterhin darf Taurolidin nicht bei Kindern unter sechs Jahren angewendet werden (Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016a).

Erst seit ein paar Jahren ist bekannt, dass Taurolidin auch antineoplastische Wirkungen hat. In Zellkulturen und Tiermodellen konnte in vitro und in vivo gezeigt werden, dass verschiedenste Tumorarten und deren Metastasen reduziert wurden. Die Reduktion von Tumorzellen konnte beim Colonkarzinom und bei durch die laparoskopische Operation entstandenen Trokarmetastasen (Jacobi et al., 1997), Gallenblasenkarzinom (Jacobi et al., 1999), Osteosarkomen (Walters et al., 2007), Prostata (Darnowski et al., 2004) oder malignes Melanom (Sun et al., 2007) nachgewiesen werden. Im Menschen gibt es erste Ergebnisse beim Glioblastom (Stendel, 2006) und Adenokarzinom des Magens (Braumann, 2006). Die möglichen Wirkmechanismen sind vielfältig und nicht geklärt. Interessant ist, dass Taurolidin die Produktion von Zytokinen wie TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor) und IL-1 (Interleukin-1) hemmt. Dies ist nicht nur eine wichtige Funktion in der Immunabwehr, sondern auch bei der Neoangiogenese im Tumorausbreitungsgebiet (Lanfrancone et al., 1992; Petrovic et al., 2003).

Möhler et al. konnte außerdem in der humanen V. umbilicalis, in kleinen Gefäßen des Knochenmarks und der Haut nachweisen, dass Taurolidin oder Taurultam die Endothelzellproliferation und die Endo-

thelzelladhäsion durch Laminin hemmt. Ausgeschlossen werden konnte die Hemmung der Adhäsion durch Kollagen 1 oder Fibronectin. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die VEGF induzierte Angiogenese effektiv gehemmt wird. Möhler et al. konnten zwar keine Endothelzellschäden detektieren, dennoch wird vermutet, dass es zur Apoptose der Zellen durch Anoikis kommt. Dieser Begriff bezeichnet einen programmierten Zelltod von Zellen, die den Zell-Matrix Kontakt verloren haben (Möhler, 2008).

2.3 Fragestellung

Durch den demographischen Wandel und die damit verbundene Zunahme von Gefäßerkrankungen wird die Nachfrage nach Gefäßtransplantaten weiter ansteigen. Bisher gibt es keine einheitlichen Regelungen für Gewebekbanken, welche antimikrobiellen Dekontaminationslösungen verwendet werden sollen (Bisdas & Teebken, 2010). Die Prozessierung von Gefäßen unterliegt dennoch den strengen Regelungen des Gewebegesetz bzw. Arzneimittelgesetzes (Bundestag, 2007, 2012). Von besonderer Bedeutung ist die Frage, welche Dekontaminationslösungen einerseits ein gutes antimikrobielles Ergebnis bringen, andererseits aber die funktionelle Qualität des Transplantates nicht beeinträchtigen. Hierzu liegen in der Literatur kaum systematische Studien vor. In einer früheren Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine häufig eingesetzte Dekontaminationslösung mit einer erheblichen Einschränkung der funktionellen Qualität des Gefäßtransplantates einherging (Ebner et al., 2011). Ziel dieser Studie ist es die Qualität von Gefäßtransplantaten weiter zu verbessern. Einerseits lag der Fokus auf dem Erhalt der Vitalität des Gefäßes, andererseits auf der gleichzeitig sicheren Abdeckung des üblichen Keimspektrums. Außerdem wurde aufgrund der aktuellen Resistenzlage von Antibiotika ein Antiseptikum getestet. Aufbauend auf den Ergebnissen aus der Dissertation von Frau Dr. med. Garbe, wurde die Gefäßprotektionslösung TiProtec[®] (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim) verwendet (Garbe, 2011). Die Testungen erfolgten an humanen A. mammaria interna. Die Kaltlagerung dieser Gefäße erfolgte zusammen mit der jeweiligen Dekontaminationslösung in TiProtec[®]. Getestet wurden zwei Antibiotikamixturen und ein Antiseptikum, letzteres in zwei verschiedenen Konzentrationen. Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit eruiert:

1. Gibt es Unterschiede zwischen den Dekontaminationslösungen im Hinblick auf den Erhalt der rezeptorabhängigen oder rezeptorunabhängigen Kontraktionsantwort der Gefäße zu unterschiedlichen Lagerungszeiten?
2. Bestehen Unterschiede zwischen den Lösungen beim Erhalt der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Relaxationsantworten?
3. Werden NO-, Prostazyklin- und K_{Ca} -vermittelte Signalwege der endothelabhängigen Relaxation durch die Kaltlagerung in den unterschiedlichen Dekontaminationslösungen beeinflusst?
4. Sind die einzelnen Substanzen der Mixturen in der TiProtec[®]-Lösung über einen definierten Zeitraum stabil?
5. Treten zytotoxische Effekte am Gefäß bei der Verwendung der Dekontaminationslösungen auf?

3 Methodik und Material

3.1 Chemikalien und Lösungen

Für die Herstellung der Puffer und für die Aufbereitung der Reagenzien wurden die Grundchemikalien von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) oder von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Speziellere Reagenzien, Medikamente und Lagerungslösungen wurden von den nachfolgend gelisteten Firmen bezogen (Tabelle 3.1).

Tab. 3.1: Verwendete Substanzen und deren Herstellerfirmen

Substanz	Hersteller
Sterile 0,9%ige NaCl-Trägerlösung	Serumwerk Bernburg AG (Bernburg, Deutschland)
Acetylcholin, Noradrenalin, Natriumnitroprussid, Apamin, Indomethacin, Charybdotoxin, Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
N ^G -Monomethyl-L-Arginin	Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Deutschland)
TiProtec [®] -Lösung	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH (Bensheim, Deutschland)
Gentamicinsulfat (Refobacin)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Clindamycin Kabi	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Metronidazol (0,5%)	Delta Select / AlleMan Pharma GmbH (Rimbach, Deutschland)
Flucloxacillin-Natrium (Staphylex), Fluconazol, Itraconazol	SmithKline Beecham Pharma GmbH (Gronau, Deutschland)
Taurolidin	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)

Bei der Vorbereitung der Experimente wurde Noradrenalin mit Ascorbinsäure (20 μ M), EDTA (40 μ M) und HCl (1 M) vermischt. Indomethacin wurde in Ethanol aufgelöst. Bei allen weiteren Lösungen wurde physiologische Salzlösung (PSS, Tabelle 3.2) als Lösungsmittel verwendet.

3.2 Vorbereitung der arteriellen Gefäße

Als Grundlage der Organbadversuche diente PSS. Um eine maximale Vorkontraktion der Gefäßringe zu erzielen, wurde eine kaliumangereicherte physiologische Salzlösung (KPSS) verwendet.

Für jeden Versuchstag wurden beide Lösungen aus einer 5-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt und mit Carbogen (5% CO₂ und 95% O₂) für ca. 20 Minuten begast.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von CaCl₂ und Glucose.

Die Zusammensetzung der beiden Lösungen ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.2: Inhaltsstoffe der Organbadlösungen physiologische Salzlösung (PSS) und Kalium angereicherte physiologische Salzlösung (KPSS)

Substanz	PSS	KPSS
NaCl	119	-
KCl	4,7	123,7
MgSO ₄	1,17	1,17
NaHCO ₃	25	25
KH ₂ PO ₄	1,18	1,18
EDTA	0,027	0,027
CaCl ₂	2,5	2,5
Glucose	5,5	5,5

3.2 Vorbereitung der arteriellen Gefäße

3.2.1 Verwendete Arterien

Für die experimentelle Untersuchung der Gefäßfunktion wurden Teilstücke der humanen A. mammaria interna verwendet. Die anatomisch korrekte Bezeichnung dieser Arterie lautet A. thoracica interna. Im Rahmen koronarer Bypassoperationen wird die A. mammaria interna als Autotransplantat (Empfänger=Spender) genutzt.

3.2.2 Chirurgische Gewinnung der Arteriensegmente

Die kardiochirurgische Abteilung des Herzzentrums Dresden stellte die Teilstücke der A. mammaria interna dem Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus zugehörig der Technischen Universität Dresden zur Verfügung. Präoperativ erfolgte eine schriftliche Aufklärung der Patienten. Der Patient genehmigte durch seine Unterschrift die Verwendung eines Reststückes seiner A. mammaria interna für diese Studie. Es erfolgte keine vorherige Selektion der Patienten. Unabhängig von den Versuchsergebnissen fand eine Auswertung der Patientenakten bezüglich der präoperativen Medikation und der kardiovaskulären Risikofaktoren statt.

Im Verlauf der routinemäßigen Bypassoperation wurde die Arterie vom Thorax freipräpariert und es erfolgte durch den Operateur eine Abschätzung für die benötigte Länge zur Überbrückung der koronaren Gefäßeinengung. Das normalerweise verworfene distale Ende der A. mammaria interna wurde in ein mit 25 ml TiProtec® -Lösung befülltes Transportgefäß gegeben und bei 4 °C unter Einhaltung der Kühlkette in das Institut für Physiologie gebracht. Anschließend erfolgte die weitere Präparation der A. mammaria interna.

Die Gewinnung und Nutzung der Arteriensegmente waren durch ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus genehmigt (EK 307-12-2007).

3.2.3 Vorbereitung der Arteriensegmente

Die in der Transportlösung gelagerten Arterienstücke wurden auf einer silikonbeschichteten Präparierschale fixiert. Um eine Austrocknung während der Präparation zu verhindern, wurde das Präparat mit der TiProtec®-Lösung vollständig benetzt. Unter dem Mikroskop wurde mithilfe einer Federschere und einer kleinen Pinzette (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) die Arterie vorsichtig vom überschüssigen Fettgewebe freipräpariert. Die Arteriensegmente wurden im Anschluss in 1,5–2,5 mm große Stücke geschnitten. Je nach Länge der Arterie wurden somit zwei bis sechs Gefäßringe gewonnen. Anschließend wurde vorsichtig unter dem Mikroskop ein Gefäßring auf die Pins in der Edelstahlkammer eines Myographen eingespannt und die Gefäßfunktion ermittelt. Das Zeitintervall vom Transport bis zur fertigen Präparation lag bei ca. einer Stunde. Die restlichen Gefäßringe wurden in Gefäße mit der jeweiligen antimikrobiellen Dekontaminationslösung oder für die Kontrollgruppe in TiProtec® gelagert. Für definierte Lagerungszeiträume wurden die Gefäßsegmente bei 4 °C aufbewahrt. Visuell sichtbar beschädigte Teilstücke der Arteriensegmente wurden im Vorfeld aussortiert und nicht für die Funktionsmessung verwendet. Dies erfolgte beispielsweise, wenn keine intakte Wandschichtung mehr gegeben war oder Metallclips zur Unterbindung von Nebenästen am Hauptast der A. mammaria interna angebracht worden waren.

3.2.4 Dekontaminationslösungen und Lagerungszeiten

In dieser Studie wurden drei antimikrobielle Dekontaminationslösungen und eine Kontrolllösung verwendet. Die Lösung der Kontrollgruppe bestand nur aus TiProtec®. Die Eigenschaften der verwendeten Substanzen wurden bereits in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Die Forschungsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Rauen (Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen) hatte in Vorversuchen die Zytotoxizität verschiedener Antibiotika und Antimykotika mittels LDH-Freisetzung (Laktatdehydrogenase) getestet. Anhand dieser Versuche wurde zusammen mit Prof. Dr. rer. nat. et. rer. medic. habil. Jatzwauk (Krankenhaushygiene und Umweltschutz, Universitätsklinikum Dresden) eine Auswahl der getesteten antimikrobiellen Stoffe getroffen, welche das typische Keimspektrum von Gefäßtransplantaten abdeckt. Da die Vorversuche an Zellkulturen stattfanden, wurden eigene LDH-Versuche mit Gefäßringen der A. mammaria interna gemacht (siehe Kapitel 3.5). Um die Wirkung der antimikrobiellen Stoffe auf die Funktionalität der Gefäße weiter differenzieren zu können, wurden Einzelmessungen mit einer La-

gerungszeit von 24 Stunden in TiProtec® und jeweils einem Antibiotikum oder Antimykotikum getestet. Danach wurden folgende Mixturen zusammengestellt:

Tab. 3.3: Zusammensetzung der Antibiotikamixturen

Substanz	AB1 (Mixtur 1)	AB2 (Mixtur 2)
Gentamicinsulfat	40	40
Clindamycin	200	200
Metronidazol	200	200
Flucloxacillin	1000	–
Fluconazol	100	100
Itraconazol	20	–

Die angegebenen Endkonzentrationen [$\mu\text{g}/\text{ml}$] wurden in TiProtec® gelöst

Neben den **Antibiotikamixturen 1 und 2** wurden auch zwei Gruppen des Antiseptikum Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. **Mixtur 3** bestand aus einer 0,5% Lösung in TiProtec®. **Mixtur 4** war eine 0,002% Taurolidin-Mischung in TiProtec®. Um die Funktionsfähigkeit der chirurgisch gewonnenen A. mammaria interna zu überprüfen, wurde nach dem Transport zeitnah die erste Messung an einem einzelnen Ring des Gefäßsegmentes durchgeführt. Das Arteriensegment lagerte zu der Zeit wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt nur in der Gefäßprotektionslösung TiProtec®. Je nach Länge der Arterie konnten unterschiedlich viele Gefäßringe gewonnen werden. Es wurden nach Verfügbarkeit der Segmente standardisierte Lagerungszeiten von zwei, 24, 48, 96 Stunden und sieben Tagen getestet. In Gewebekammern findet eine Dekontamination der sogenannten Homografts durch eine 48 Stunden-Lagerung in einer Nährlösung unter Zugabe von Antibiotika und Fungiziden statt (Bisdas & Teebken, 2010). Deshalb wurde ein zusätzlicher Lagerungszeitraum (48h_1Wo) mit 48 Stunden Dekontaminationszeit und anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage nur in TiProtec®-Lösung getestet. Die entsprechenden Konservierungslösungen wurden bei 4 °C gelagert.

3.3 Untersuchungsmethode für die Gefäßfunktion

3.3.1 Versuchsaufbau und -vorbereitung

Die Gefäßfunktionsmessungen wurden mit einem Myographen vom Modell 610M der Firma Danish Myo Technology (Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Dieses Gerät erlaubt sowohl Gefäßringe mit einem kleinen Durchmesser von ca. 100 μm als auch Gefäßringe mit einem großen Durchmesser von bis zu 10 mm zu messen. Der Myograph verfügt über vier separate und beheizte Edelstahlkammern. In jeder Kammer befinden sich zwei Metallpins, an denen der Gefäßring aufgehängt wird. Einer der Pins ist mit einer Mikrometerschraube gekoppelt, sodass eine Regulierung des Abstandes der beiden Pins zueinander möglich ist. Der andere Pin ist mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Jede Organbadkammer besitzt

3.3 Untersuchungsmethode für die Gefäßfunktion

außerdem eine eigene Gaszufuhr (siehe Abb. 3.1 A und 3.1 B). Im Rahmen der Vorbereitung für die Gefäßfunktionsmessung erfolgte unter einem Mikroskop die micrometeregenaue Annäherung der Pins zueinander. Im Anschluss wurde vorsichtig der Gefäßring (1,5–2,5 mm) auf die Pins geschoben. Es wurde darauf geachtet, die Gefäßintima zu schonen (siehe Abb. 3.1 C). Danach wurde die Edelstahlkammer mit 5 ml gekühlter PSS (4 °C) gefüllt. Unter dem Mikroskop wurde mittels einer Okularstichplatte die Segmentlänge des Gefäßes in mm bestimmt. Um ein physiologisches Milieu in der Organbadkammer zu erzeugen, wurde langsam innerhalb von 30 Minuten die Temperatur auf 37 °C erhöht. Während der gesamten Versuchsdauer wurde diese Einstellung beibehalten. Zusätzlich wurden die Kammern kontinuierlich mit Carbogen begast, um die Zellen mit Sauerstoff zu versorgen und einen pH von 7,4 zu gewährleisten. Für die viermalige Spülung der Organbadkammer wurde nach jedem Teilschritt der Versuche 37 °C erwärmte PSS verwendet.

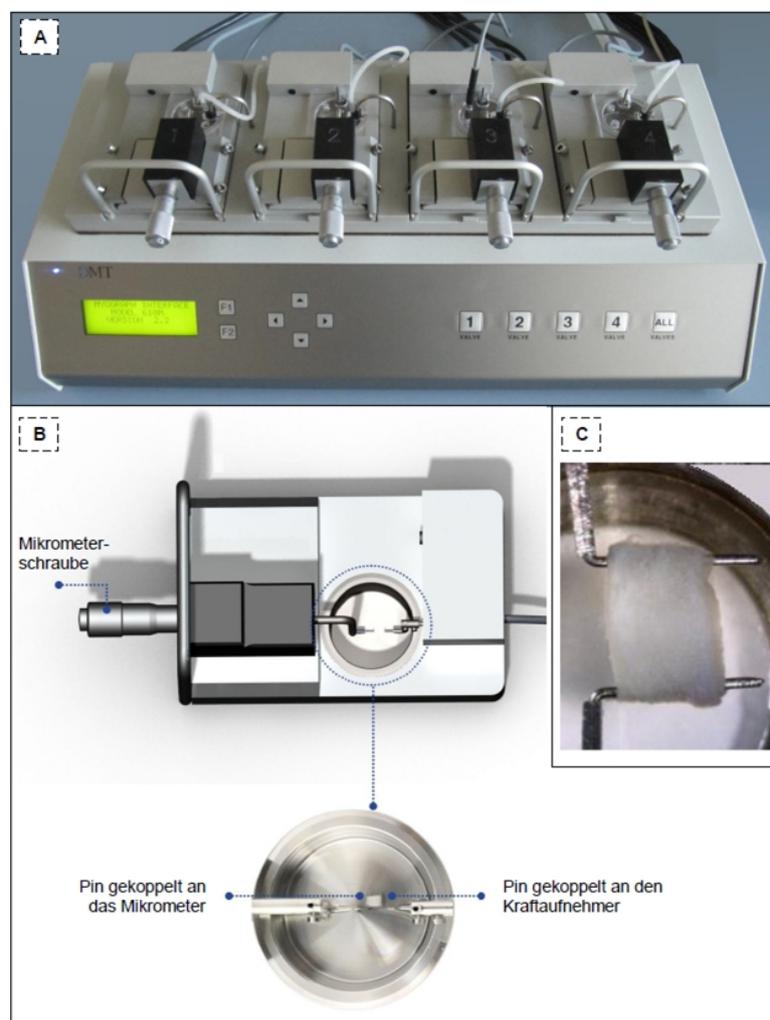


Abb. 3.1: Versuchsaufbau Myograph, entnommen aus der Arbeit von (Garbe, 2011), A) Myograph Modell 610M der Firma DMT, B) Skizzierte Darstellung einer Organbadeinheit und vergrößertes Bild der Edelstahlkammer, C) Aufgespannter Gefäßring der A. mammaria interna auf die Metallpins

3.3.2 Versuchsprinzip und -ablauf

Der Versuchsablauf zur Gefäßfunktionsmessung wird in einzelne Teilschritte gegliedert. Diese werden nachfolgend beschrieben und die zugehörigen Grundlagen erläutert.

1. Teilschritt: Voreinstellungen

Da bei den Versuchen unterschiedliche Arteriensegmente getestet werden, müssen vergleichbare Messungen unter klar definierten Bedingungen stattfinden. Eine wichtige Voraussetzung ist die Vordehnung der glatten Muskelzellen im Gefäß, weil dadurch die Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktile Apparates bestimmt wird. Generell wird bei solchen experimentellen Studien der innere Gefäßumfang normiert, um eine sehr gute kontraktile Antwort zu erhalten. Grundlage bietet das Paper von Mulvany und Halpern (Mulvany & Halpern, 1976). In Vorversuchen an der A. mammaria interna konnte gezeigt werden, dass die beste Reaktivität bei einem transmuralen Druck von 100 mm Hg gegeben ist (Garbe, 2011). Um den spezifischen Gefäßumfang für jede einzelne Arterie zu ermitteln, wurde eine passive Ruhedehnungskurve erstellt. Diese Dehnung wurde erreicht, indem die Pins mittels einer Mikrometerschraube voneinander entfernt wurden und nach einer Minute die erreichte Kraft (F) gemessen wurde. Die Vordehnung erfolgte stufenweise (siehe Abb. 3.2). Bei jeder Stufe wurde die Wandspannung (T) mit dem dazugehörigen inneren Umfang (IC) der Arterie berechnet. Im Anschluss konnte aus diesen errechneten Parametern mit Hilfe der Laplace-Gleichung der effektive Druck (P_i) ermittelt werden (Formel 3). Damit ist eine Abschätzung des Gefäßinnendrucks möglich.

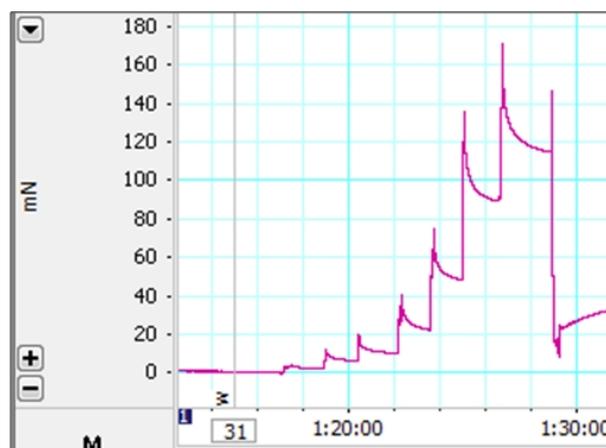


Abb. 3.2: Originale Ruhedehnungskurve (Kraft [mN], Zeit [min])

Formel 1: Wandspannung (T)

$$T[mN/mm] = \frac{F}{2 \cdot a}$$

$$F = \text{Kraft [mN]}$$

$$a = \text{Länge des Gefäßes [mm]}$$

Formel 2: Innerer Gefäßumfang (IC)

$$IC[\mu m] = (2 + \pi) \cdot d + 2 \cdot (X_i - X_0)$$

d = Durchmesser der Pins [200 μm]

X_i = Einstellung des Mikrometers

X_0 = Ausgangsstellung des Mikrometers

Formel 3: Effektiver Druck (P_i)

$$P_i[mN/mm^2] = \frac{T \cdot 2 \cdot \pi}{IC}$$

In einem Diagramm wurden die beiden Parameter die Wandspannung (T) und der innere Gefäßumfang (IC) aufgetragen und mittels der LabChart[®]-Software (Version 5.0, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) in eine Exponentialfunktion überführt. Die schrittweise Vordehnung wurde beendet, wenn der effektive Druck (P_i) den transmuralen Zieldruck von 100 mm Hg überschritten hatte. Außerdem wurde die Isobare für 100 mm Hg berechnet.

Formel 4: Berechnung der Isobaren ($T_{100 \text{ mm Hg}}$)

$$T_{100 \text{ mm Hg}} = 100 \text{ mm Hg} \cdot \frac{IC}{2 \cdot \pi}$$

Der innere Umfang des Arteriensegments (IC_{100}) entsprach dem Schnittpunkt der Exponentialfunktion und der Isobaren bei einem transmuralen Druck von 100 mm Hg. Dieser ermittelte innere Umfang wurde mit der Mikrometerschraube eingestellt und im gesamten Verlauf des Versuches beibehalten.

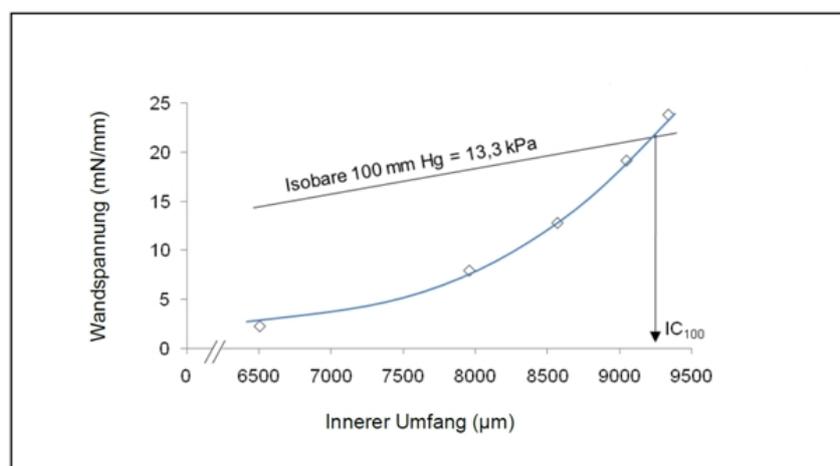


Abb. 3.3: Ermittlung des inneren Gefäßumfangs (IC_{100}) (Garbe, 2011)

2. Teilschritt: Kontraktion

Um eine Normalisierungsphase einzuhalten wurde mindestens 10 Minuten abgewartet. Dadurch konnte sich der Ruhetonus des Gefäßes wieder einstellen. Danach wurde PSS abgesaugt und durch 5 ml KPSS (123 mM) ersetzt. Mit diesem Vorgang wurde die Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen im Gefäß überprüft. Durch KPSS wurde eine rezeptorunabhängige Kontraktionsantwort durch Depolarisation erzeugt (Nelson & Quayle, 1995). Die Inkubation dauerte solange bis ein Plateau erreicht wurde. Allerdings wurde nicht länger als maximal fünf Minuten gewartet. Im Anschluss erfolgte eine viermalige Spülung mit PSS. Es erfolgte eine erneute Zugabe von PSS und es wurde wieder die Normalisierungsphase von mindestens 10 Minuten eingehalten. Um die Reproduzierbarkeit dieser Kontraktionsantwort zu überprüfen, wurde dieser Vorgang noch einmal wiederholt.

Nach der Stabilisierungsphase wurde erneut PSS in die Edelstahlkammer pipettiert und 5 μ l Noradrenalin (NA, 10 mM) hinzugefügt. Es erfolgte eine α_1 -rezeptorabhängige Kontraktion der glatten Muskelzellen im Gefäß (Kopf et al., 2001). Ab dem Erreichen des Plateaus wurde 10 Minuten lang die Zeit gestoppt und es wurde für jede Minute ein Messwert notiert. Danach wurde die Edelstahlkammer viermal mit PSS gespült und unter erneuter Zugabe von PSS eine zehnminütige Normalisierungsphase eingehalten. Gefäßbringe, welche keine Reaktion zeigten, wurden aussortiert.

3. Teilschritt: Relaxation

Das Relaxationsverhalten wurde mittels kumulativer Konzentrationswirkungskurven (KWK) ermittelt. Nach einer weiteren Normalisierungsphase von 10 Minuten in PSS wurden 5 μ l NA (10 mM) dazu pipettiert. Es wurde ein stabiles Kontraktionsniveau abgewartet. Danach wurde Acetylcholin (ACh) im Abstand von einer Minute in ansteigender Konzentration hinzugegeben. Es erfolgte eine endothelabhängige Relaxation über muscarinerge Rezeptoren, welche eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) bewirken (Furchgott & Zawadzki, 1980).

Tab. 3.4: Erstellung der Konzentrationswirkungskurven (KWK) von ACh

Konzentration	Zugabe (μ l)	Dauer (min)	Endkonzentration (log)
10^{-6}	5	1	-9,0
10^{-6}	10	1	-8,5
10^{-5}	3,5	1	-8,0
10^{-5}	10	1	-7,5
10^{-4}	3,5	1	-7,0
10^{-4}	10	1	-6,5
10^{-3}	3,5	1	-6,0
10^{-3}	10	1	-5,5
10^{-2}	3,5	1	-5,0
10^{-2}	10	1	-4,5

3.3 Untersuchungsmethode für die Gefäßfunktion

Im Anschluss wurde die Edelstahlkammer wieder mit PSS gewaschen, erneut PSS hinzugegeben und 10 Minuten gewartet. Analog zur KWK von ACh wurde eine weitere Kurve für Natriumnitroprussid (SNP) erstellt. Die Konzentrationen lagen im Bereich von 1×10^{-9} M bis 1×10^{-4} M. Es handelt sich hierbei um eine endothelunabhängige Vasodilatation. SNP wirkt als NO-Donor. Das freigesetzte NO diffundiert in die glatten Muskelzellen, wodurch es eine Dilatation des Gefäßes bewirkt (Kowaluk et al., 1992). Ein Beispiel für diese Messungen zeigt die Abb. 3.4.

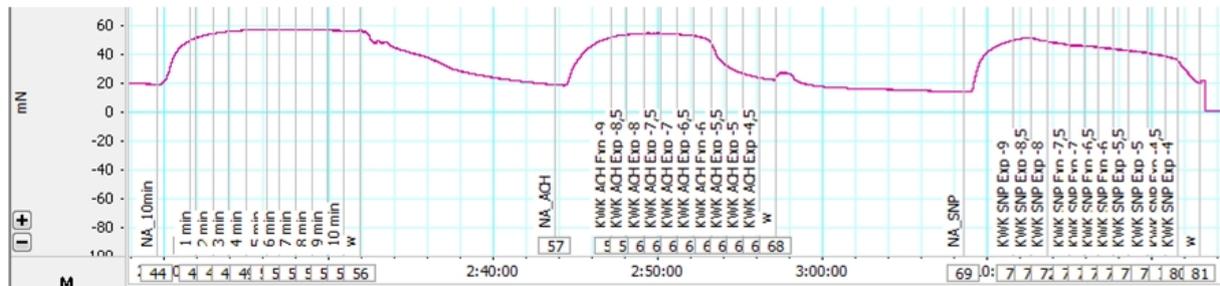


Abb. 3.4: Originalregistrierung der Kontraktion mittels NA und der KWKs von ACh und SNP (Kraft [mN], Zeit [min])

4. Teilschritt: Inhibitoren

Es gibt unterschiedliche Komponenten der endothelabhängigen Vasodilatation. Um diese differenzieren zu können, wurden einige Arteriensegmente mit spezifischen Inhibitoren der Endothel vermittelten Gefäßrelaxationen für 10 Minuten inkubiert (Tabelle 3.5). Danach erfolgte die Aufzeichnung der KWK von ACh. Diese Versuchsschritte mit selektiver Hemmung (Tabelle 3.6) wurden nur durchgeführt, wenn ausreichend Gefäßmaterial zur Verfügung stand.

Tab. 3.5: Wirkungsweise der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Wirkungsweise
N^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)	Hemmung der NO-Synthase (endothelabhängig) (Palmer et al., 1988)
Indomethacin (Indo)	Nichtselektive Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 (Hinz & Brune, 1999)
Apamin (Apa)	Hemmung von K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (Brayden, 1996)
Charybdotoxin (CTX)	Unspezifische Hemmung von K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer und großer Leitfähigkeit und spannungsabhängige Kaliumkanäle (Brayden, 1996)

Tab. 3.6: Inhibitor kombinationen und deren verwendete Konzentration

Inhibitor kombination	Konzentration
L-NMMA	100 μM
L-NMMA + Indo	100 μM + 30 μM
L-NMMA + Indo + Apa + CTX	100 μM + 30 μM + 50 nM + 50 nM

3.3.3 Datenerfassung und Auswertung

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, war einer der Pins des Myographen mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Dieser registrierte die Veränderungen des Gefäßtonus während des Versuchsablaufes. Über ein zwischengeschaltetes Datenerfassungssystem (PowerLab 8/30, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) wurden die Daten der dazugehörigen Lab-Chart[®]-Software (Version 5.0, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) zugeführt. Mit dieser Software war eine Aufzeichnung und Analyse der Daten möglich.

Zu Beginn erfolgte die Registrierung der Absolutwerte (in mN) der kontraktiven Antworten. Für die weitere Auswertung wurde die Wandspannung (T) berechnet (siehe Formel 1, Abschnitt 3.3.2). Im weiteren Verlauf wurde die maximale Kontraktionskraft durch NA auf die maximal KPSS-induzierte maximale Kontraktionsantwort bezogen und als prozentualer Wert umgerechnet. Die Wandspannungsentwicklung wurde während der Vorkontraktion ausgewertet, weil das Gerät schon sehr geringe Veränderungen des Gefäßtonus registrieren konnte.

Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Stabilitätsmessungen während der Plateauphase unter Noradrenalin und der Konzentration-Wirkungsbeziehung von ACh und SNP (Abbildung 3.4). Bezogen auf die NA-induzierte Kontraktion konnte damit die prozentuale Relaxation (R) kalkuliert werden. Grundsätzlich erfolgte dabei eine Normierung der entwickelten Kraft (F) auf die Länge des Gefäßsegmentes (siehe Formel 5).

Formel 5: Prozentuale Relaxation

$$R[\%] = 100 \cdot \frac{\Delta_i}{\Delta_{NA}}$$

mit

$$\Delta_i[mN] = \left(\frac{F_{NA}}{2 \cdot a} \right) - \left(\frac{F_i}{2 \cdot a} \right)$$

und

$$\Delta_{NA}[mN] = \left(\frac{F_{NA}}{2 \cdot a} \right) - \left(\frac{F_{Basal}}{2 \cdot a} \right)$$

F_{NA} = erfasste Kraft unter NA

F_i = Kraft bei einer definierten NA-, ACh- oder SNP-Konzentration

F_{Basal} = erfasste Kraft vor Applikation der Substanzen

a = Länge des Gefäßsegmentes

Für die Konzentration-Wirkungsbeziehung von ACh bzw. SNP werden im weiteren Verlauf die Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) verwendet. Es wurde für die Berechnung der prozentualen Relaxation (R[%]) benötigter Mittelwerte immer nur ein Arteriensegment pro Patient in die Auswertung einbezogen.

Außerdem wurde der Wert der halbmaximalen Wirkkonzentration (EC_{50}) verwendet, um die vergleichende statistische Analyse der ACh- und SNP-induzierten Dilatation durchzuführen. Der EC_{50} -Wert beschreibt die Konzentration von entweder ACh oder SNP, bei der eine halbmaximale Gefäßrelaxation erreicht wurde. Desweiteren werden in den Tabellen im Ergebnisteil noch der Wert für die maximale Vasodilatation (R_{max}) und das Maß für die Streubreite der Werte (ΔR) angegeben. Je steiler die sigmoidale Kurve verläuft, desto geringer ist die Streubreite. Je breiter bzw. flacher die Kurve, desto mehr streuen die Werte.

Um die Werte bestimmen zu können, wurde eine Kalkulation von gefitteten Konzentrations-Wirkungskurven (KWK) durchgeführt. Dies wurde durch die folgende sigmoidale Konzentrationswirkungsfunktion ($R_{(x)}$) realisiert:

Formel 6: Prozentuale Relaxation

$$R_{(x)} = \frac{R_{max}}{1 + \exp\left(\frac{-x + EC_{50}}{\Delta R}\right)}$$

R_{max} = maximale Vasorelaxation (gefittet)

x = logarithmischer Wert der applizierten Dosis

ΔR = Steilheit der Kurve im Bereich des EC_{50} -Wertes

Im nachfolgenden Ergebnisteil wurde der EC_{50} -Wert als negativer dekadischer Logarithmus ($-\log EC_{50}$) angegeben. Damit ist im Hinblick auf die KWKs eine konforme Darstellung der halbmaximal wirksamen Konzentrationen möglich.

3.4 Stabilitätsmessungen der einzelnen Stoffe

Die antimikrobiellen Stoffe in TiProtec[®] wurden zusammen mit einem Gefäßring der A. mammaria interna 96 Stunden gelagert. Die übliche Lagerungszeit von Gefäßen in Gewebebanken beträgt 48 Stunden (Bisdas & Teebken, 2010). Die längere Lagerungszeit wurde gewählt, um härtere Testbedingungen zu

schaffen. Bei den Versuchen wurden Kontrollgruppen mit TiProtec® und einem Gefäßring mit 96 Stunden Lagerung mitgeführt und parallel gemessen. Die Experimente wurden als Einfachblindstudie durchgeführt.

Die Konzentrationen der Antibiotika Flucloxacillin, Metronidazol, Clindamycin und das Antimykotikum Fluconazol in der Lagerungslösung wurden vom analytischen Labor des Institutes für klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus in Dresden getestet. Die Messungen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Oertel mittels HPLC-Messung (high performance liquid chromatography) durchgeführt. Die Messungen bezogen sich auf die Lösungen am Ende der Lagerungszeit.

Die Konzentrationen vom Antibiotikum Gentamicin und vom Antimykotikum Itraconazol wurden vom Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikum Ulm getestet. Hier wurde eine zusätzliche Gruppe als "Sofort-Messung" mitgeführt. Diese Messungen führte Oberarzt Dr. med. Steinbach durch. Die Messung für Gentamicin erfolgte mittels photometrischer/immunturbidimetrischer Messung (KIMS) am Cobas 6000 (Firma Roche mit dem Reagenz der Firma Roche). Itraconazol wurde mittels isokratischer HPLC mit Fluoreszenz-Detektion (Trennsäule der Firma Chromsystems, Probengeber (ALS), isokratische Pumpe (IsoPump), Säulenofen und Detektor der Firma Agilent) gemessen.

3.4.1 Stabilitätsmessung Taurolidin

In Anlehnung an die Methodik aus der Habilitationsschrift von Herrn Dr. med. Stendel (Stendel, 2006) wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. habil. A. Ebner die Stabilitätsmessungen von Taurolidin durchgeführt bzw. weiterentwickelt. Es wurde eine colorimetrische Methode mit NASH-Reagenz genutzt. Die NASH-Reaktion wird auch Hantzsch-Reaktion genannt (Nash, 1953). Dabei reagiert Acetylaceton (1,8 g), Eisessig (38 μ l) und Ammoniumacetat (50 μ l) mit Formaldehyd (hier mit Methylenglykol). Daraus resultiert eine gelbe Färbung der Proben (Nash, 1952, 1953). Die Stoffe wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Zunächst wurden die Proben ohne Gefäßring gemessen, um eine eventuelle Beeinflussung der Taurolidin-Messungen durch das Gewebe zu vermeiden. Die Reaktionslösungen bestanden aus 50 μ l Probelösung (Taurolidin und TiProtec®) plus 200 μ l NASH-Reagenz.

Um Wechselwirkungen der Aminosäuren in TiProtec® (siehe Abschnitt 2.2.4) mit der NASH-Lösung auszuschließen, wurden zwei Gruppen von Kalibrierungskurven erstellt. Es erfolgte eine Kalibrierung von Taurolidin und NASH-Reagenz in TiProtec® und eine Kalibrierung in Aqua dest. Dabei konnten nur sehr geringe Unterschiede in den Kurvenverläufen festgestellt werden.

Zusätzlich erfolgten Kurvendarstellungen mit unterschiedlichen Lagerungszeiten (0, 30, 60, 90 und 120 min) bei Raumtemperatur (RT), nachdem das NASH-Reagenz 30 min bei 60 °C inkubiert worden war. Die Absorptionsmessungen erfolgten an einem UV/VIS-Plattenfotometer mit Monochromator (MWG BioTech) bei 414 nm (Referenzwellenlänge 500 nm). Dabei ergab sich, dass die Abweichungen der Doppelbestimmungen der Proben nach 120 min Lagerung bei RT im Dunkeln am geringsten waren. Diese Zeit wurde für alle nachfolgenden Messungen beibehalten. Desweiteren wurden Kurvenverläufe von Taurolidin in TiProtec® (ohne Gefäßring) nach einer Lagerungszeit von vier und sieben Tagen dar-

gestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Absorption von Taurolidin sich über sieben Tage leicht erhöht. Für die nachfolgenden Messungen wurde daher eine Kontrolle ohne Gefäß mitgeführt. Nachfolgend wurde eine Eichgerade mit Taurolidin-Standards über einen Konzentrationsbereich von 2 bis 4000 $\mu\text{g/ml}$ erstellt.

Danach wurden neue Absorptionsmessungen ohne Gefäß mit Taurolidin in TiProtec[®] und Taurolidin in Aqua dest. nach null, vier und sieben Tagen Lagerungszeit durchgeführt. Neben der Kontrollgruppe ohne Gefäß wurde noch eine weitere Kontrollgruppe mit Taurin (4 mg/ml) mitgeführt. Diese Messungen dienten zum Nachweis, dass nicht Taurin, das Endprodukt des Taurolidin-Abbaus, nachgewiesen wird (siehe Abschnitt 2.2.6).

In der graphischen Darstellung der Spektren (siehe Anhang) zeigte sich eine Steigerung der Absorption bei einer Wellenlänge von ca. 414 nm. Die Absorption von TiProtec[®] und Aqua dest. unterschieden sich im genannten Wellenlängenbereich nur sehr gering. Auffällig waren hohe Absorptionswerte der Kurven im Bereich 220 bis 300 nm. Dies ist vermutlich auf eine unspezifische Absorption durch Aminosäuren zurückzuführen.

Eine weitere Auffälligkeit waren hohe Absorptionsmessungen nach "sofort-Messungen" bei Konzentrationen von 2000 $\mu\text{g/ml}$ und 4000 $\mu\text{g/ml}$ bei 312 nm. Zur weiteren Differenzierung, erfolgten zusätzliche Absorptionsmessungen in diesem Wellenlängenbereich. Die Gruppen wurden in der jeweiligen Testlösung gemessen. Dabei wurden die Proben für 30 min bei 60 °C inkubiert und 300 min bei RT gelagert.

Tab. 3.7: Gruppeneinteilung für Absorptionsmessungen bei 312 nm

Gruppe	Testlösungen
pur	TiProtec [®] oder Aqua dest.
NASH	TiProtec [®] oder Aqua dest.
Taurin	TiProtec [®] oder Aqua dest.
Taurolidin	TiProtec [®] oder Aqua dest.

Für die Absorption bei der Wellenlänge 312 nm zeigte sich in der Gruppe "pur" eine sehr geringe Absorption von $0,2 \pm 0,004$ SD. Auch in den Gruppen NASH und Taurin zeigten sich geringe Absorptionen von $0,7 \pm 0,01$ SD bis $1,3 \pm 0,04$ SD. In allen drei Gruppen zeigte die Testlösung TiProtec[®] im Gegensatz zu Aqua dest. eine leicht höhere Absorption. Die Gruppe Taurolidin zeigte in beiden Testlösungen eine deutlich höhere Absorption von ca. $3,7 \pm 0,02$ SD. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Taurin nur eine kleine Absorption bei 312 nm zeigt. Auch TiProtec[®] zeigte nur eine sehr geringe Absorption im angegebenen Wellenbereich. Außerdem konnten keine signifikanten Wechselwirkungen von TiProtec[®] mit dem NASH-Reagenz nachgewiesen werden.

Nach der Etablierung der Methodik wurden Absorptionsmessungen der Probengemische (0,5% Taurolidin in TiProtec[®]) mit Gefäßring nach zwei und 48 Stunden Lagerung durchgeführt. Um Messveränderungen durch Proteine zu vermeiden, wurden danach die Lösungen 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Quantifizierung genutzt. Es erfolgten Dreifachbestimmungen. Es wurden Kon-

trollgruppen für zwei und 48 Stunden Lagerungszeit ohne Gefäß mitgeführt. Außerdem wurde für die korrekte Anwendung des Kalibrierkurvenverfahrens eine Leerprobe ohne Taurolidin eingesetzt. Diese Probe wurde mit sechs weiteren, unterschiedlich konzentrierten Kalibrierlösungen (31,3 bis 1000 $\mu\text{g/ml}$) aufgestockt.

Als Standard in den Wells wurden 50 μl Probe und 200 μl NASH-Reagenz festgelegt. Um die Linearität der Kalibrierungskurven zu gewährleisten, wurden die Proben insgesamt 1:100 verdünnt. Die Reaktionslösungen wurden 20 min bei 60 °C inkubiert. Anhand von Vorversuchen konnte ermittelt werden, dass sich die Werte nach 10 min Messung nur noch sehr gering verändert haben. Deshalb wurden bei den Wiederholungsmessungen die Absorptionen zum Zeitpunkt null, nach fünf und nach 10 Minuten gemessen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei 0,99 und beschreibt damit einen sehr guten linearen Zusammenhang der Ergebnisse. Durch das Mitführen der Kontrollgruppen konnten Ein-Punkt-Kalibrierungen durchgeführt werden.

3.5 LDH-Messungen

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. habil. A. Ebner wurde die Aktivität vom Enzym Lactatdehydrogenase (Sigma-Aldrich, L7525-12,5 KU, Cytotoxicity Detection Kit) mittels einem UV/VIS Plattenphotometer (mit Monochromator von MWG BioTech) für die verschiedenen Lagerungsproben bzw. -zeiten bestimmt. Folgende Probenkonstellationen wurden verwendet:

Tab. 3.8: Lagerungszeiten von den Gefäßen in den verschiedenen Probelösungen

Lagerungsprobe	Lagerungszeiten		
TiProtec [®]	2h	48h	48h_1Wo*
Taurolidin (0,5%) + TiProtec [®]	2h	48h	48h_1Wo*
Antibiotika-Mix 1 + TiProtec [®]	2h	48h	48h_1Wo*
*48h_1Wo = Lagerung 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung und im Anschluss die Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec [®] -Lösung			

Es wurden Standards für die Kalibrierungskurven festgelegt (0,1; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5, und 10 U/ml). Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Probelösung mitgeführt. Als Standardlösung wurden 100 μl Probengemisch und 100 μl vom Reaktionsmix (LDH) gemischt. Die Proben wurden vor Licht geschützt und 30 min bei 492 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 600 nm. Für jede Lagerungsprobe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden auch Kontrollgruppen zu den angegebenen Lagerungszeiten ohne Gefäß als Dreifachbestimmung gemessen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei 0,997. Da Kontrollgruppen mitgeführt wurden, konnten die Werte mittels Ein-Punkt-Kalibrierungen bestimmt werden.

3.6 Keimzahlbestimmung

In Zusammenarbeit mit Frau B. Zatschler wurden die Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Die Gefäßringe wurden 48 Stunden in der jeweiligen Probelösung gelagert. Folgende Lagerungsproben wurden gemessen: TiProtec[®], Antibiotika-Mix 1 (+ TiProtec[®]), Taurolidin 0,002% (+ TiProtec[®]) und Taurolidin 0,5% (+ TiProtec[®]). Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt. Im Anschluss wurden die Proben auf einem Standard-Nährmedium (AE92) der Firma Carl-Roth GmbH + Co. KG eine Woche bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Absorptionsmessungen wurden an einem Photometer der Firma Shimadzu (UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-2100) durchgeführt. Die Absorption wurde bei 660 nm gemessen.

3.7 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS (Version 23, IBM Deutschland GmbH, München, Deutschland). Nach Aufbereitung der Daten für das Programm, wurde die Deskriptive Statistik durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und graphisch mittels Histogrammen.

Um Unterschiede zwischen den Lagerungsgruppen und Lagerungszeiten zu analysieren, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Im Anschluss erfolgten im Detail die Vergleiche zwischen den einzelnen Lagerungsgruppen und Lagerungszeiten mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests. Um die Alphafehler-Kumulierung bei den multiplen Vergleichen zu neutralisieren, wurde eine Bonferroni-Adjustierung mitgeführt.

Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden im Einzelnen mithilfe von linearen Modellen mit festen Effekten analysiert. Auch hier erfolgte eine Bonferroni-Adjustierung.

Für alle Tests gilt, dass alle p-Werte $< 0,05$ einen statistisch signifikanten Unterschied anzeigen. Zur Verdeutlichung der Relevanz der statistisch signifikanten Ergebnisse wurde die Effektstärke nach der Methodik von Hedge's g^* berechnet. Dabei gelten folgende Regelungen: $g^* < 0,5$ = kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8$ = mittlerer Effekt; $g^* > 0,8$ = großer Effekt.

4 Ergebnisse

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

In den nachfolgenden Kapiteln wird das rezeptorunabhängige- und rezeptorabhängige Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente dargestellt. Verglichen werden die Lagerungslösungen TiProtec® (TiP), Antibiotikamixtur 1 (AB1), Antibiotikamixtur 2 (AB2) und Taurolidin in zwei verschiedenen Konzentrationen (Tau 0,002% und Tau 0,5%). Um den Verlauf der maximalen kontraktile Antworten darzustellen, erfolgt die Darstellung in den Diagrammen über alle Lagerungszeiten (sofort, 2h, 24h, 48h, 96h, 1Wo und 48h_1Wo). Die Darstellung der Wandspannungsentwicklung unter Noradrenalin über eine Stimulationsphase von 10 Minuten erfolgt nur für ausgewählte Lagerungszeiten. Die restlichen Diagramme befinden sich im Anhang.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch Fehlerbalkendiagramme. Der zentrale Punkt stellt den Mittelwert dar. Die Fehlerbalken werden als 95%- Konfidenzintervall (CI 95%) angegeben. Bei signifikanten Unterschieden, wird dies mit einem Verbindungsbalken im Diagramm dargestellt. Zusätzlich wurde die Effektstärke nach Hedge's g wie unter Abschnitt 3.7 dargestellt angegeben.

Tabelle 4.1 zeigt die Anzahl der verwendeten Arteriensegmente pro Dekontaminationslösung zu unterschiedlichen Lagerungszeiten. Gefäße die überhaupt keine Reaktion zeigten, wurden aus der Wertung ausgeschlossen und sind nicht berücksichtigt.

Tab. 4.1: Anzahl der verwendeten Arteriensegmente während der Funktionsmessungen

LL/LZ	sofort	2h	24h	48h	96h	1 Wo	48h_1Wo
TiP	19	32	27	18	21	17	20
AB1	-	18	12	12	16	9	17
AB2	-	15	12	7	16	13	10
Tau 0,002%	-	13	13	10	18	10	9
Tau 0,5%	-	4	-	1	-	-	-

LL = Lagerungslösung, LZ = Lagerungszeit, 48h_1Wo = Lagerung 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung und im Anschluss die Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung

4.1.1 Rezeptorunabhängige Kontraktion mittels KPSS

Wird die kaliumangereicherte physiologische Salzlösung (KPSS, 123 mM) zum Organbad hinzugegeben, werden die glatten Muskelzellen der Media depolarisiert und es kommt zur rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion.

Interessant ist, dass es keine signifikanten Unterschiede der maximal ausgelösten Kontraktionsantworten zwischen den Dekontaminationslösungen gab. Die maximale Tonusentwicklung der Arteriensegmente unterschied sich jedoch zwischen den Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungsgruppe.

In der TiProtec®-Gruppe gab es nur einen kleinen relevanten Unterschied zwischen den Lagerungszeiten. Zwar waren die Maximalwerte der Kontraktionsantworten in der Zeit zwischen 2 Stunden und 48 Stunden signifikant unterschiedlich ($p=0,012$), allerdings ergab sich durch die Berechnung der Effektstärke nach Hedge's g^* nur ein kleiner Effekt.

Dahingegen eindeutig war der Verlust der Wandspannungsentwicklung in der Antibiotikamixtur 1. Nach 2- bis 24 Stunden sank die kontraktile Antwort der Gefäße mit jeder weiteren Lagerungszeit signifikant ab (siehe Abbildung 4.1 und Tabelle 4.2). Die maximal induzierte Tonusentwicklung unterschied sich bei der Antibiotikamixtur 2 während unterschiedlicher Lagerungszeiten nicht signifikant.

Bei Taurolidin 0,002% sank die Wandspannung signifikant in der Zeit zwischen 2 Stunden und 48 Stunden ($p=0,046$). Deutlicher war der Unterschied zwischen 2 Stunden und 1 Woche ($p=0,002$).

Für die Funktionsmessungen bei Taurolidin 0,5% lagen zu wenige funktionstüchtige Gefäße vor, sodass bei der Streuung der Daten keine statistisch sicherenden Aussagen möglich waren. Wegen der Vollständigkeit wurde diese Lagerungslösung trotzdem in den Diagrammen dargestellt.

Interessant ist, dass bei allen Lagerungsgruppen eine Lagerung für 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung und im Anschluss die Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung im Vergleich zu eine Woche durchgehenden Lagerung in der Dekontaminationslösung keinen signifikanten Unterschied der rezeptorunabhängigen, maximalen Kontraktionsantwort ergab.

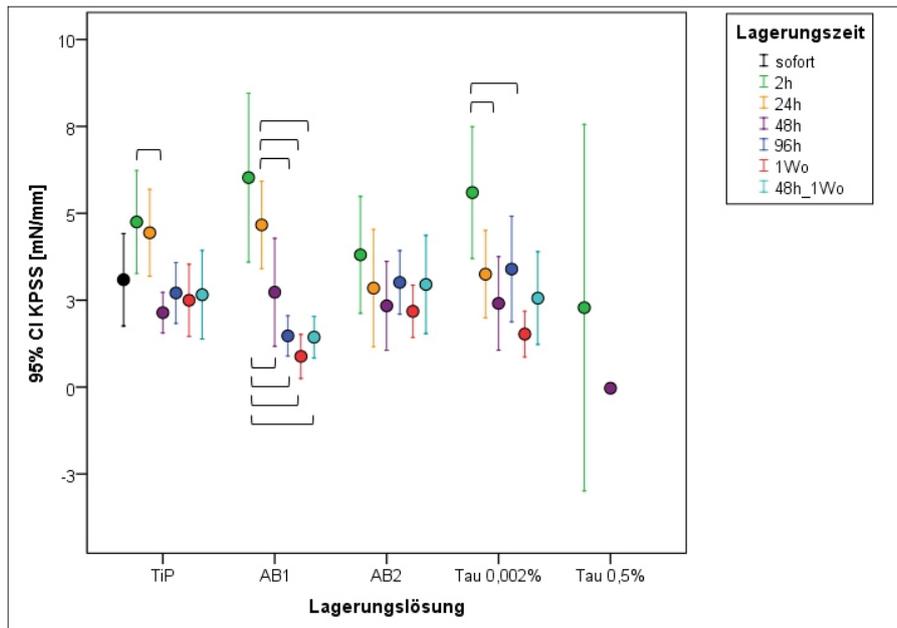


Abb. 4.1: Rezeptorunabhängige Wandspannungsentwicklung unter KPSS. Darstellung der Lagerungslösungen zu unterschiedlichen Lagerungszeiten. Der zentrale Punkt stellt den Mittelwert dar. Die Fehlerbalken werden als 95%- Konfidenzintervall (CI 95%) angegeben.

Tab. 4.2: Signifikanzen und Effektstärken der rezeptorunabhängigen Wandspannungsentwicklung

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanz	Hedge's g*
TiP	2h	48h	0,012	0,41
		96h	0,000	1,22
AB1	2h	48h	0,009	0,78
		96h	0,000	1,22
		1Wo	0,000	1,23
		48h_1Wo	0,000	1,25
		96h	0,017	2,03
	1Wo	0,012	2,27	
Tau 0,002%	2h	48h	0,046	1,15
		96h	0,002	1,60
		1Wo	0,002	1,60

Vergleich zwischen den Lagerungszeiten mit der jeweiligen Lagerungslösung.

Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt;

$g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

4.1.2 Rezeptorabhängige Kontraktion mittels Noradrenalin

Bei der rezeptorabhängigen Kontraktionsantwort wird durch Applikation von $10 \mu\text{M}$ Noradrenalin zum Organbad eine α -rezeptorabhängige Vasokonstriktion ausgelöst. Für die Auswertung wurde der maxi-

male Wert zu Beginn der Stimulationsphase verglichen.

Es zeigte sich bei der statistischen Analyse ein ähnliches Bild wie bei der Auswertung von KPSS. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungsgruppen, jedoch bestanden Unterschiede zwischen den Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungsgruppe. Insgesamt wurden höhere maximale Werte für die Kontraktion unter Noradrenalin erreicht als unter KPSS.

Bei der Ti Protec[®]-Gruppe war eine zeitliche Verschiebung zu erkennen. Die Lagerungszeiten 24 Stunden und 96 Stunden unterschieden sich signifikant ($p=0,049$). Nach der Berechnung der Effektstärke nach Hedge's g^* , ergab sich ein mittlerer Effekt. Unter KPSS ergab der signifikante Unterschied zwischen 2- und 48 Stunden dagegen nur einen kleinen Effekt.

Wie bei KPSS war ein deutlicher Abfall des Kontraktionsverhaltens der Arteriensegmente in der Antibiotikamixtur 1 zu detektieren. Nach 24- bis 48 Stunden sanken die Werte signifikant (siehe Abbildung 4.2 und Tabelle 4.3). Die Berechnungen der Effektstärken nach Hedge's g^* ergaben eine große Relevanz der signifikanten Ergebnisse.

Dagegen konnte auch bei der rezeptorabhängig- im Vergleich zur rezeptorunabhängig induzierten, maximalen Kontraktionsantwort bei der Antibiotikamixtur 2 kein signifikanter Unterschied bei den Lagerungszeiten berechnet werden.

In der Taurolidin 0,002%-Gruppe gab es signifikante Unterschiede zwischen 2 Stunden und 96 Stunden ($p=0,030$) sowie zwischen 2 Stunden und 1 Woche ($p=0,002$). Die signifikanten Ergebnisse zeigten eine große Effektstärke. Die maximalen Werte für die rezeptorabhängige Kontraktion konnten in der Taurolidin 0,5%-Gruppe aus demselben Grund wie bei der rezeptorunabhängigen Tonusentwicklung, nicht bewertet werden.

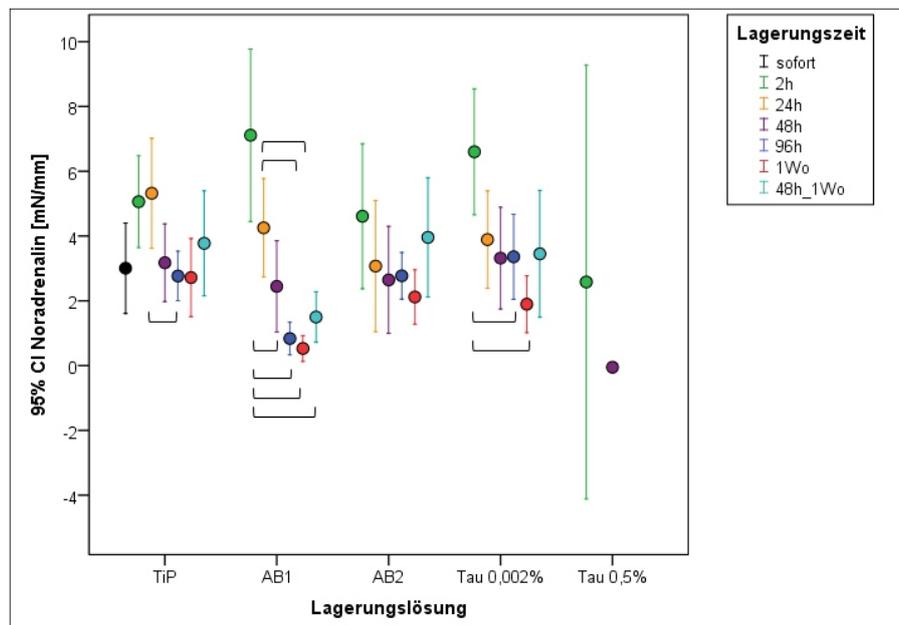


Abb. 4.2: Rezeptorabhängige Wandspannungsentwicklung unter Noradrenalin. Darstellung der Lagerungslösungen zu unterschiedlichen Lagerungszeiten.

Tab. 4.3: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der rezeptorabhängigen Wandspannungsentwicklung

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanz	Hedge's g*
TiP	24h	96h	0,049	0,73
AB1	2h	48h	0,000	1,03
		96h	0,000	1,55
		1Wo	0,000	1,44
		48h_1Wo	0,000	1,38
		24h	96h	0,028
		1Wo	0,050	1,93
Tau 0,002%	2h	96h	0,030	1,09
		1Wo	0,002	1,77

Vergleich zwischen den Lagerungszeiten mit der jeweiligen Lagerungslösung.

Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5$ = kleiner Effekt;

$g^* 0,5-0,8$ = mittlerer Effekt; $g^* > 0,8$ = großer Effekt.

4.1.3 Stabilitätsmessungen der Kontraktionsplateaus unter Noradrenalin

Noradrenalin führt an den Gefäßpräparaten in der Regel zu einer anhaltenden Tonisierung. An funktionell guten Präparaten hält diese Tonisierung mindestens 10 Minuten konstant an (Plateau). Als Kriterium für unveränderte Gefäßstabilität wurde die Veränderung des Gefäßtonus nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Noradrenalin über 10 Minuten gewertet.

Für jede Minute wurde ein neuer Messwert registriert und die prozentuale Veränderung berechnet (siehe Formel 5, Abschnitt 3.3.3). Der Zeitpunkt 0 min ist in den Diagrammen als Bezugszeitpunkt angegeben. Die Gefäßspannung zum Zeitpunkt 0 min angegeben in [mN/mm] diente hierbei als Bezugswert, auf den sich die nachfolgend ermittelten Werte beziehen. Negative Prozentwerte bedeuten, dass das Gefäßsegment ohne weitere Noradrenalinzufuhr weiter kontrahiert. Positive Werte bedeuten, dass das Gefäß relaxiert. Das theoretische Optimum wäre ein Wert von 0. Je näher die Werte von 1 bis 10 min diesem Wert kommen, desto stabiler ist die Kontraktionsphase.

Exemplarisch wurden einige Diagramme in diesem Kapitel aufgeführt und die Übrigen befinden sich im Anhang. In der Tabelle 4.4 sind alle Signifikanzen für die Stabilitätskontrolle aufgeführt. Für alle in diesem Kapitel aufgeführten signifikanten Ergebnisse konnte eine hohe Relevanz nach der Berechnung der Effektstärke nach Hedge's g^* ermittelt werden. Auch in diesem Kapitel konnte die Tauolidin-Gruppe 0,5% wegen der großen Variabilität der gemessenden Werte nicht gewertet werden. Dennoch wird diese Gruppe zur Vollständigkeit in den ausgewählten Diagrammen mit aufgeführt.

Insgesamt erhöhte sich die Streuung der Daten bei längerer Lagerungsdauer und im Verlauf der Stimulationsphase unter Noradrenalin. Während zwei und 24 Stunden konnte eine stabile Kontraktionsantwort während der Stimulationsphasen bei allen Lagerungsgruppen nachgewiesen werden.

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

Bei darüber hinausgehenden Lagerungszeiten (ab 48 Stunden) nahm die Stabilität der Kontraktionsphase in der Antibiotikagruppe 1 im Vergleich zu den anderen Lagerungsgruppen signifikant ab. Zwischen den anderen Lagerungsgruppen konnte kein signifikanter Abfall der Kontraktion während der Stabilitätsphase berechnet werden. Im Detail kann folgendes beschrieben werden:

Während der Lagerungsdauer von 2 Stunden blieb in allen Lagerungsgruppen das Kontraktionsplateau noch stabil (siehe Abbildung 4.3).

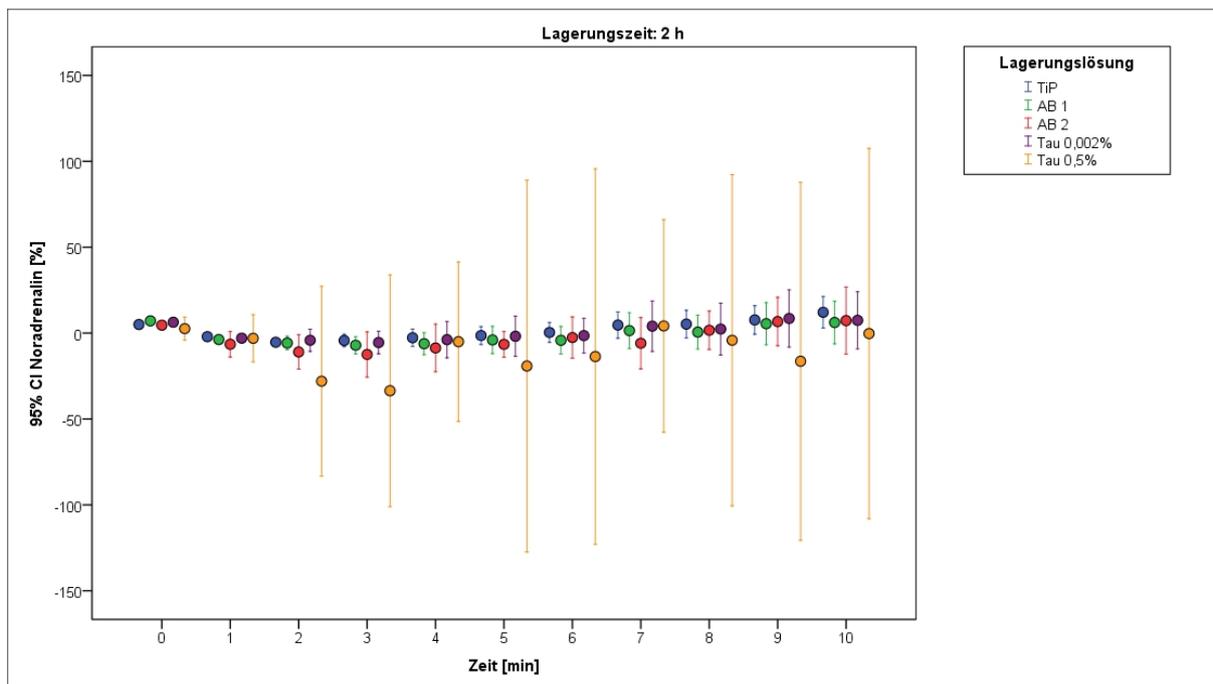


Abb. 4.3: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 2 Stunden

Nach 24 Stunden Lagerungszeit divergierten die Werte graphisch stärker und es bestand eine leichte Tendenz zur Kontraktion. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Lagerungslösungen über die 10 Minuten Stimulationsphase durch Noradrenalin nicht signifikant (siehe Anhang, Abbildung B.1).

Signifikante Unterschiede waren erst nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden zu detektieren (siehe Abbildung 4.4). Ab einer Stimulationsdauer von fünf Minuten unterschieden sich die Antibiotikamixtur 1 und der TiProtec[®]-Gruppe signifikant voneinander ($p=0,036$). Ab der achten Minute konnten signifikante Unterschiede zwischen der Antibiotikagruppe 1 gegenüber TiProtec[®] und Taurolidin 0,002% berechnet werden (siehe Tabelle 4.4).

Wurden die Arteriensegmente 96 Stunden gelagert, zeigte sich der Abfall der kontraktilen Antwort der Antibiotikamixtur 1 gegenüber der anderen Lagerungsgruppen zeitlich früher. Bereits ab der vierten Minute wurden signifikante Unterschiede auch zwischen der ersten und zweiten Antibiotikagruppe ($p=0,031$) berechnet. Diese signifikanten Unterschiede zwischen den drei Lagerungsgruppen blieben bis zur zehnten Minute nachweisbar (siehe Tabelle 4.4).

Am Deutlichsten zeigte sich nach 1 Woche Lagerungsdauer nicht nur rechnerisch sondern auch graphisch

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

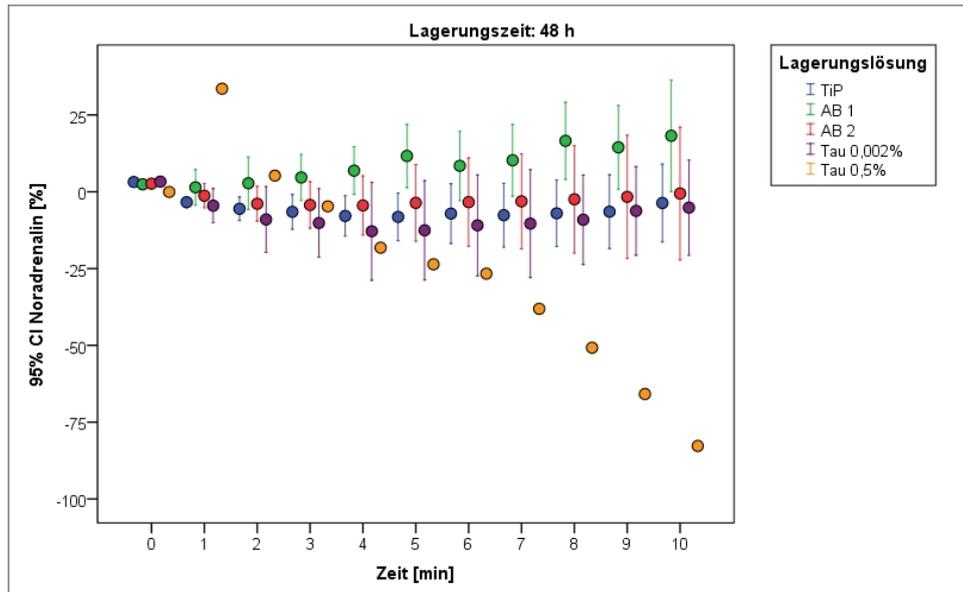


Abb. 4.4: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden

die Reduzierung der Kontraktionsantwort der Antibiotikagruppe 1 gegenüber den anderen Lagerungsgruppen (Abbildung 4.5). Bereits ab der dritten Minute konnten signifikante Unterschiede zwischen der Antibiotikagruppe 1 gegenüber TiProtect® ($p = 0,005$) und Taurolidin 0,002% ($p = 0,024$) nachgewiesen werden. Ab der vierten Minute konnte der signifikante Unterschied auch gegenüber der Antibiotikagruppe 2 ($p = 0,010$) berechnet werden.

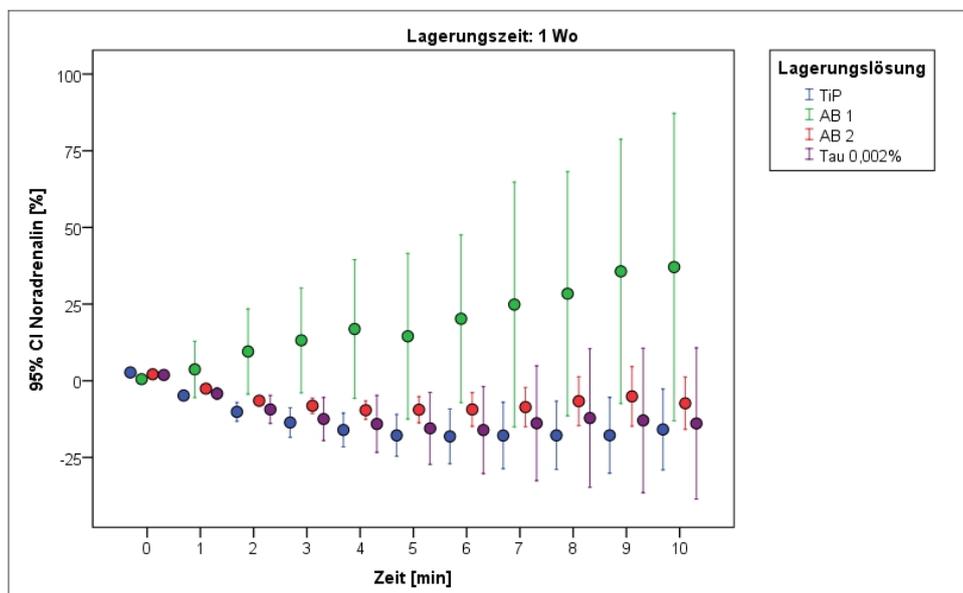


Abb. 4.5: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 1 Woche

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

Interessant ist, dass nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage nur in TiProtec®-Lösung, die Werte während der Plateauphase sehr streuten. Dies betraf alle Dekontaminationsprotokolle. Signifikante Unterschiede konnten wegen der hohen Streuung erst ab der achten Minute zwischen der Antibiotikagruppe 1 und TiProtec® detektiert werden (Tabelle 4.4). Zwischen den anderen Lagerungsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede während der Stimulationsphase unter Noradrenalin.

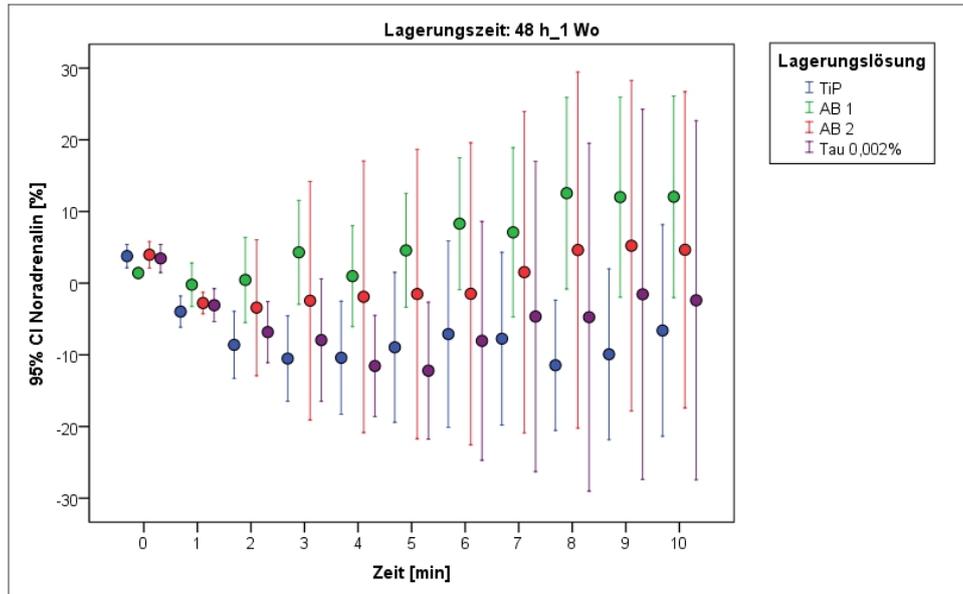


Abb. 4.6: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48_1Wo)

Tab. 4.4: Signifikante Unterschiede der Wandspannungsentwicklung während der Stimulationsphase (0-10min) mit Noradrenalin

Lagerungszeit	Plateau [min]	LL	LL	Signifikanzen	Hedge's g*
48h	5	AB1	TiP	0,036	1,22
			Tau 0,002%	0,020	1,23
	8	AB1	TiP	0,011	1,09
			Tau 0,002%	0,020	1,23
			Tau 0,002%	0,020	1,23
9	AB1	TiP	0,038	0,88	
		Tau 0,002%	0,049	0,93	
10	AB1	TiP	0,025	0,80	
		Tau 0,002%	0,049	0,93	
96h	4	AB1	AB2	0,031	1,15
			Tau 0,002%	0,038	1,67
	5	AB1	TiP	0,041	0,98
			AB2	0,033	0,76
			Tau 0,002%	0,017	1,11

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

1Wo	6	AB1	TiP	0,007	1,27
			AB2	0,002	0,93
			Tau 0,002%	0,002	1,45
	7	AB1	TiP	0,000	1,50
			AB2	0,000	1,09
			Tau 0,002%	0,000	1,71
	8	AB1	TiP	0,001	1,20
			AB2	0,000	0,95
			Tau 0,002%	0,000	1,60
	9	AB1	TiP	0,000	1,25
			AB2	0,000	0,95
			Tau 0,002%	0,000	1,76
	10	AB1	TiP	0,000	1,18
			AB2	0,000	1,00
			Tau 0,002%	0,000	1,59
	3	AB1	TiP	0,005	1,74
			Tau 0,002%	0,024	1,45
	4	AB1	TiP	0,000	1,67
			AB2	0,010	1,34
			Tau 0,002%	0,003	1,33
	5	AB1	TiP	0,000	1,36
			AB2	0,026	1,01
			Tau 0,002%	0,005	1,07
	6	AB1	TiP	0,000	1,49
			AB2	0,003	1,21
			Tau 0,002%	0,000	1,22
	7	AB1	TiP	0,000	1,20
			AB2	0,000	0,95
			Tau 0,002%	0,000	0,91
8	AB1	TiP	0,000	1,29	
		AB2	0,000	0,98	
		Tau 0,002%	0,000	0,91	
9	AB1	TiP	0,000	1,37	
		AB2	0,000	1,04	
		Tau 0,002%	0,000	1,02	
10	AB1	TiP	0,00	1,19	
		AB2	0,000	1,00	

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

			Tau 0,002%	0,000	0,95
48h_1Wo	8	AB1	TiP	0,001	1,01
	9	AB1	TiP	0,003	0,80
	10	AB1	TiP	0,019	0,61

Vergleich der Lagerungslösungen (LL) zu einer bestimmten Lagerungszeit bei steigender Minutenzahl während der 10 minütigen Stimulationsphase. Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

4.1.4 Kontraktionsvergleich der einzelnen Substanzen nach 24h Lagerung

Um eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Komponenten der Dekontaminationslösungen in TiProtec[®] während der Vasokonstriktion zu eruieren, wurden zusätzliche Messungen nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden durchgeführt. Verglichen wurden Metronidazol (M), Fluconazol (F), Clindamycin (C), Gentamicin (G), Staphylex (S) und Itraconazol (I), welche jeweils einzeln der Lagerungslösung TiProtec[®] zugesetzt wurden.

Auch hier wurden zuerst die maximale Kontraktion unter KPSS und die maximale Kontraktionsantwort mit dem Erreichen des Plateaus durch Noradrenalin untersucht. Im Anschluss erfolgte der Vergleich der Wandspannungsentwicklung während der Plateauphase unter Noradrenalin. Tabelle 4.5 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der verwendeten Arteriensegmente bei den einzelnen Substanzen in TiProtec[®]-Lösung.

Tab. 4.5: Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die einzelnen Substanzen in TiProtec[®]-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden

LZ/Substanz	TiP+M	TiP+F	TiP+C	TiP+G	TiP+S	TiP+I
24h	9	8	8	9	8	7

LZ = Lagerungszeit

Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen den Vergleich der maximalen Kontraktionsantworten zwischen den einzelnen Substanzen. Bei der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sowohl bei KPSS als auch bei Noradrenalin errechnet werden. Dennoch zeigt sich visuell, dass die Werte in der Gruppe mit Fluconazol unter KPSS stärker streuen als diejenigen der anderen Substanzgruppen. Unter Noradrenalinstimulation ist die Streuung der Werte für die Vasokonstriktion bei den einzelnen Gruppen sehr ähnlich.

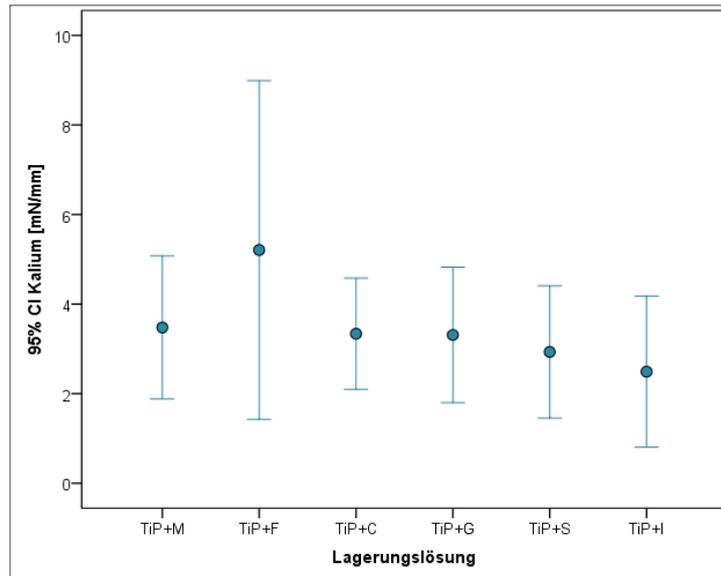


Abb. 4.7: Vergleich der maximalen Vasokonstriktion der einzelnen Substanzen der Dekontaminationslösungen unter KPSS

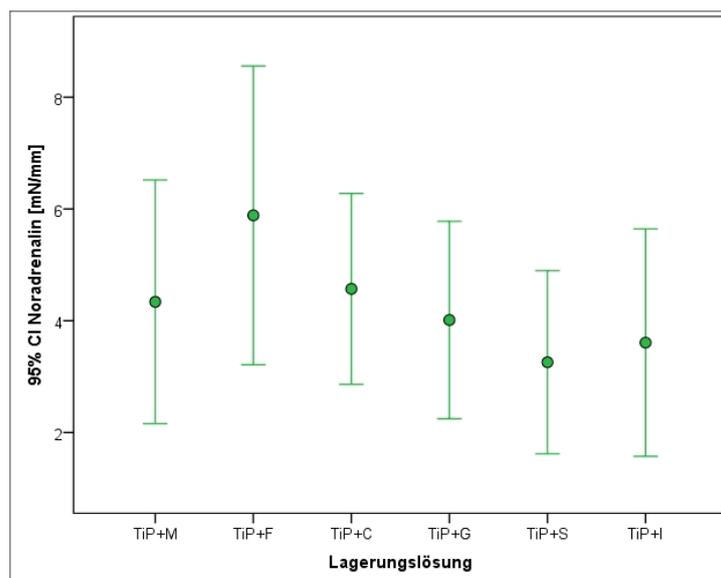


Abb. 4.8: Vergleich der maximalen Vasokonstriktion der einzelnen Substanzen der Dekontaminationslösungen unter Noradrenalin

Interessant ist, dass es bei der Wandspannungsentwicklung während der Stimulationsphase unter Noradrenalin signifikante Unterschiede zwischen den Substanzgruppen gab (siehe Tabelle 4.6). Am meisten störte Staphylex die anhaltende Kontraktion und unterschied sich signifikant von den anderen Gruppen. Schon ab der vierten Minute gab es Unterschiede zwischen Clindamycin ($p=0,019$) oder Itraconazol ($p=0,013$). Teilweise gab es auch Signifikanzen ab der fünften Minute zwischen Flucloxacillin und Gentamicin. Erst mit der neunten und zehnten Minute unterschied sich Flucloxacillin auch von Metronidazol ($p=0,042$ [9 min], $p=0,007$ [10 min]) und von Fluconazol ($p=0,028$ [9 min], $p=0,010$ [10 min]). Die

4.1 Kontraktionsverhalten der Arteriensegmente

Substanzgruppe mit Gentamicin wies noch einen signifikanten Unterschied in der neunten Minute mit Itraconazol ($p=0,025$) auf. Auch hier nahm die Streuung der Werte mit dem Zeitverlauf der Stimulationsphase zu.

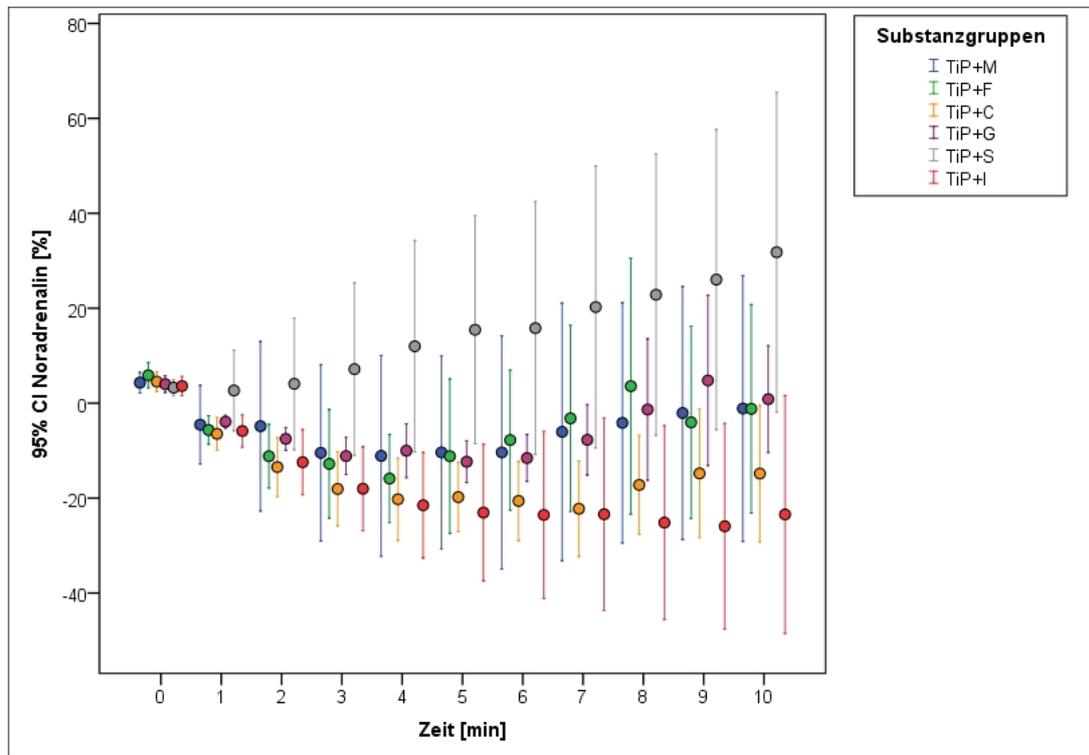


Abb. 4.9: Vergleich der Wandspannungsentwicklung der Substanzgruppen während 10 min-Stimulation mit Noradrenalin nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in TiProtec® mit den unterschiedlichen Antibiotika-Zusätzen.

Tab. 4.6: Signifikante Unterschiede und Effektstärken in der Wandspannungsentwicklung der Substanzgruppen nach 24 Stunden Lagerungszeit während der Stimulationsphase (0–10min) mit Noradrenalin

Zeit [min]	Substanzgruppe	Substanzgruppe	Signifikanzen	Hedge's g*
4	TiP+S	TiP+C	0,019	1,47
		TiP+I	0,013	1,49
5	TiP+S	TiP+C	0,007	1,52
		TiP+G	0,046	1,31
		TiP+I	0,002	1,54
6	TiP+S	TiP+C	0,004	1,42
		TiP+I	0,001	1,38
7	TiP+S	TiP+C	0,000	1,48
		TiP+G	0,043	1,05
		TiP+I	0,000	1,37

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

8	TiP+S	TiP+C	0,001	1,39
		TiP+I	0,000	1,50
9	TiP+S	TiP+M	0,042	0,74
		TiP+F	0,028	0,89
		TiP+C	0,001	1,41
		TiP+I	0,000	1,53
	TiP+G	TiP+I	0,025	1,24
10	TiP+S	TiP+M	0,007	0,82
		TiP+F	0,010	0,92
		TiP+C	0,000	1,40
		TiP+G	0,015	0,99
		TiP+I	0,000	1,49

Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt;
 $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

In dem folgenden Kapitel wird das endothelabhängige- und endothelunabhängige Relaxationsverhalten unter Acetylcholin (ACh) und Natriumnitroprussid (SNP) präsentiert. In den Diagrammen wird jeweils die maximale Relaxationsantwort nach Stimulation mit ACh bzw. SNP für die verschiedenen Lagerungsgruppen und die unterschiedlichen Lagerungszeiten dargestellt.

Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Maximalwerte. Dabei handelt es sich um Maximalwerte, die als Mittelwertbildung aus den Messdaten ermittelt wurden. In den Tabellen werden die signifikanten Unterschiede mit der jeweiligen Effektstärke nach dem Modell von Hedge's g^* angegeben.

Nachfolgend wurde eine Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente in Form einer Konzentrations-Wirkbeziehung durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Methodik einer Konzentrationswirkungskurve (KWK) (siehe Abschnitt 3.3.2; 3. Teilschritt). Ziel war die Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration von ACh bzw. SNP, die zu einer halbmaximalen Relaxation führte (EC_{50} -Wert). In Übersichtstabellen wurde zusätzlich der gefittete Maximalwert für die Vasorelaxation (R_{max} [%]-Werte) und die jeweilige Steigung der KWK im Bereich des EC_{50} -Wertes (ΔR -Wert) angegeben. Niedrige ΔR -Werte bedeuten einen flachen Kurvenverlauf. Dies bedeutet, dass es trotz steigender Konzentration z.B. von ACh nur zu einer geringen Wirkungsänderung (prozentuale Relaxation) kommt. Hohe ΔR -Werte bedeuten einen steilen Kurvenverlauf mit großer Wirkungsänderung unter steigender Konzentration des Stimulans.

Die Berechnung dieser Parameter erfolgte mittels mathematischen Fittens mit der Konzentrationswirkungsfunktion (Abschnitt 3.3.3, Formel 6). Aufgrund des geringeren Standardfehlers wurde für die Berechnung der signifikanten Unterschiede zwischen den Maximalwerten, den Maximalwerten aus der Mit-

telwertbildung aus den Messdaten den Vorzug gegeben gegenüber den gefitteten Maximalwerte (R_{max}). Beschriebene Rechtsverschiebungen des sigmoidalen Kurvenverlaufs bedeuten, dass höhere Konzentrationen an ACh bzw. SNP benötigt wurden, um die halbmaximale Relaxation (EC_{50} -Wert) zu erreichen. Die gegenteilige Erklärung gilt für eine beschriebene Linksverschiebung. Die Abbildung 4.10 zeigt eine exemplarische KWK.

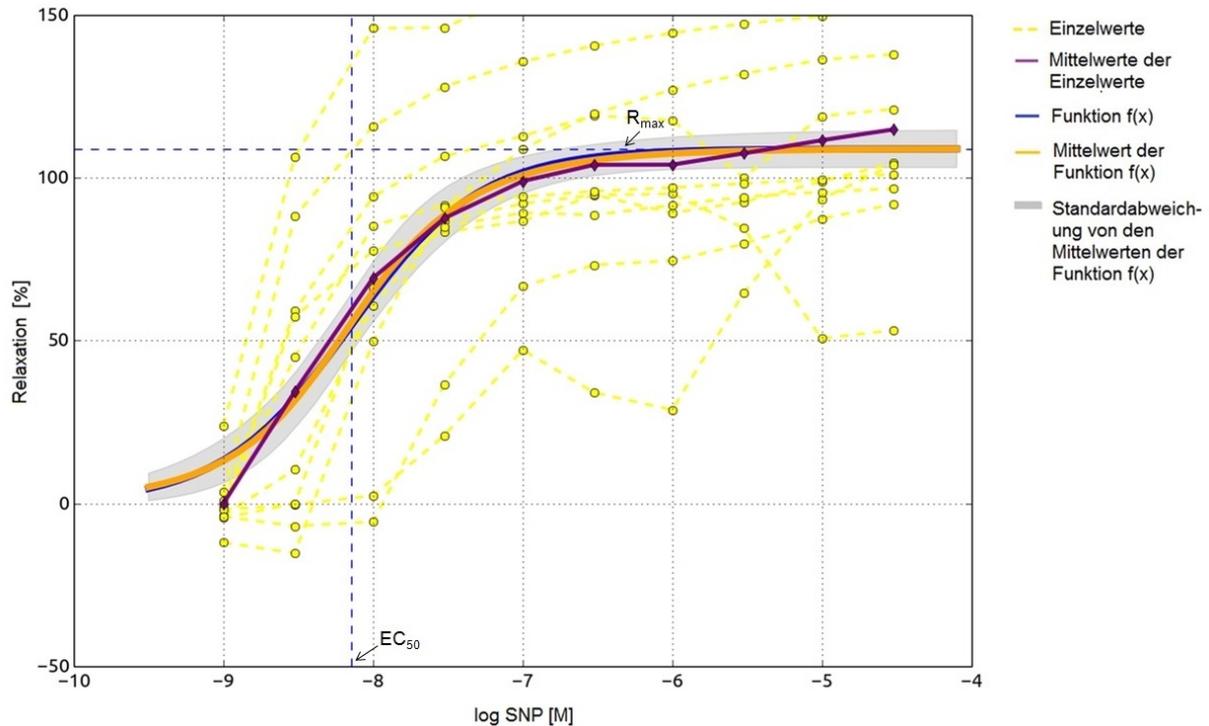


Abb. 4.10: Darstellung einer Konzentrationswirkungskurve (KWK) am Beispiel von SNP R_{max} = gefitteter Maximalwert, EC_{50} -Wert = halbmaximale Vasodilatation

Die graphische Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente erfolgte als Konzentrations-Wirkbeziehung in Form von Fehlerbalkendiagrammen. Gezeigt wird der Mittelwert mit dem dazugehörigen 95%- Konfidenzintervall (95% CI). Auf die Darstellung der Daten als KWK's wurde aufgrund der besseren Übersichtlichkeit der Darstellung von Fehlerbalken verzichtet. Es erfolgt die Darstellung von einigen ausgewählten Diagrammen. Die restlichen Abbildungen sind im Anhang zu finden. Die Berechnung von signifikanten Unterschieden erfolgte bei jeder stufenweisen Konzentrationserhöhung von ACh bzw. SNP zu einer bestimmten Lagerungszeit zwischen den unterschiedlichen Lagerungslösungen. Auch hier werden die signifikanten Ergebnisse in Tabellenform wiedergegeben sowie die dazugehörige Effektstärke nach Hedge's g^* ermittelt und dargestellt.

Die Funktionsmessungen ergaben bei Taurolidin 0,5% zu wenige funktionelle Gefäße, sodass nur von wenigen Gefäßsegmenten eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung erhoben werden konnte. Dennoch werden sie zur Vollständigkeit in den Abbildungen mit aufgeführt und beschrieben. Tabelle 4.7 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Arteriensegmente bei der Analyse des Relaxationsverhaltens.

Tab. 4.7: Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die Analyse der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Relaxationsantwort

LL/LZ	sofort	2h	24h	48h	96h	1Wo	48h_1Wo
TiP	18	30	25	17	21	16	18
AB1	-	17	12	12	15	8	16
AB2	-	15	12	7	16	12	10
Tau 0,002%	-	13	11	10	18	10	9
Tau 0,5%	-	4	-	-	-	-	-

LL = Lagerungslösung, LZ = Lagerungszeit

4.2.1 Endothelabhängige Relaxation mittels Acetylcholin

Die statistische Analyse der maximal induzierten Relaxationswerte ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Dekontaminationslösungen gab. Dagegen gab es Signifikanzen innerhalb der Lagerungslösungen zwischen den Lagerungszeiten (siehe Tabelle 4.8 und Abbildung 4.11). Im Detail kann für die einzelnen Lagerungsgruppen folgendes festgehalten werden:

In der TiProtec[®]-Gruppe nahm die endothelabhängige Vasodilatation mit Zunahme der Lagerungszeit ab. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei Messungen an Arteriensegmenten, welche sofort nach der Entnahme gemessen wurden im Vergleich zu Segmenten, welche 96 Stunden ($p=0,007$) bzw. 1 Woche ($p=0,006$) gelagert wurden oder 48 Stunden in TiProtec[®] und danach für weitere fünf Tage in frische TiProtec[®]-Lösung umgelagert wurden ($p=0,0045$).

Wie auch bei der kontraktilen Antwort nahm die endothelabhängige Vasodilatation nach Lagerung in der Antibiotikamixtur 1 über die Dauer der Lagerungszeit ab. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei Arteriensegmenten, die 2 Stunden gelagert wurden mit Segmenten, welche 96 Stunden ($p=0,002$) bzw. 1 Woche ($p=0,025$) gelagert wurden oder 48 Stunden in der Antibiotikamixtur 1 gelagert und im Anschluss für weitere fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung umgelagert wurden ($p=0,002$). Bei der Antibiotikamixtur 2 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen 2 Stunden und 96 Stunden ($p=0,027$) berechnet. In der Taurolidingruppe (0,002%) traten keine signifikanten Unterschiede bei unterschiedlich langer Lagerungsdauer auf. Alle berechneten signifikanten Unterschiede hatten eine große Effektstärke nach dem Berechnungsmodell von Hedge's g^* .

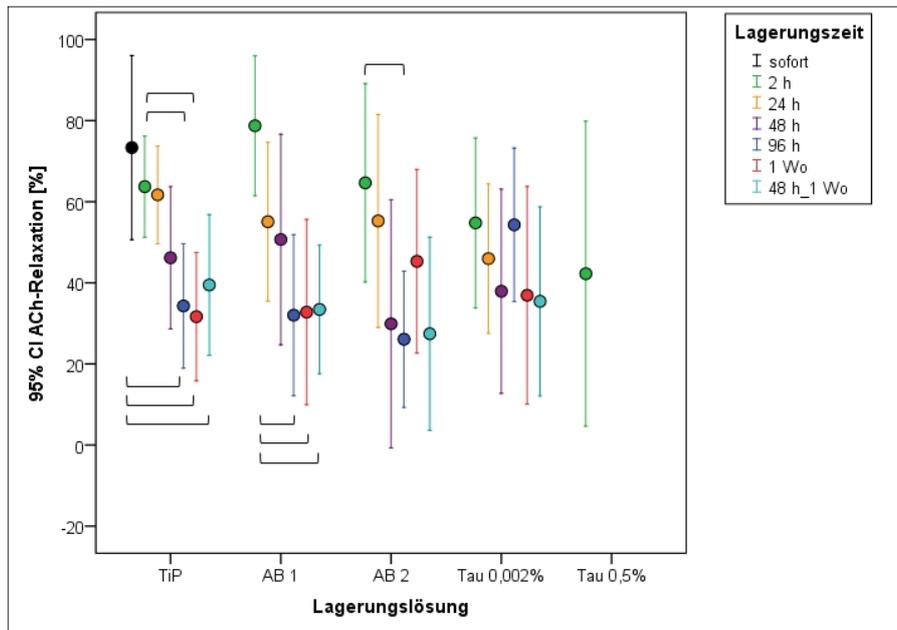


Abb. 4.11: Endothelabhängige Vasodilatation durch ACh. Darstellung der maximalen Relaxation nach Lagerung in den unterschiedlichen Lagerungslösungen über unterschiedlichen Lagerungszeiten.

Tab. 4.8: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der endothelabhängigen Relaxationen durch ACh

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanzen	Hedge's g*
TiP	sofort	96h	0,007	1,09
		1Wo	0,006	1,12
		48h_1Wo	0,045	1,13
	2h	96h	0,049	0,81
		1Wo	0,040	0,86
	AB1	2h	96h	0,002
1Wo			0,025	1,39
48h_1Wo			0,002	1,33
AB2	2h	96h	0,027	0,93

Vergleich zwischen den Lagerungszeiten einer Lagerungslösung. Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 = \text{kleiner Effekt}; g^* 0,5-0,8 = \text{mittlerer Effekt}; g^* > 0,8 = \text{großer Effekt}.$

4.2.2 Endothelunabhängige Relaxation mittels Natriumnitroprussid

Grundsätzlich waren Unterschiede in der endothelunabhängigen Relaxation zwischen unterschiedlich langer Lagerungsdauer geringer ausgeprägt als bei Testung der endothelabhängigen Relaxation (Abbildungen 4.11, 4.12). Interessant ist, dass es hier aber erstmals signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungsgruppen zu einer bestimmten Lagerungszeit gab. Wird das Arteriensegment 48 Stunden in

einer Dekontaminationslösung gelagert und im Anschluss weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung umgelagert, gab es bei dieser Lagerungsdauer signifikante Unterschiede zwischen der Antibiotikamixtur 1 und der Antibiotikamixtur 2 ($p=0,040$). Dieses signifikante Ergebnis wies allerdings nur eine mittlere Effektstärke auf. Eine hohe Effektstärke zeigte sich dagegen bei dem signifikanten Unterschied zwischen der Antibiotikamixtur 1 und Taurolidin 0,002% ($p=0,012$). In der Antibiotikagruppe 2 gab es auch einen signifikanten Unterschied zwischen 24 Stunden und 96 Stunden ($p=0,048$). Dieses signifikante Ergebnis wies eine hohe Effektstärke auf (siehe Tabelle 4.9).

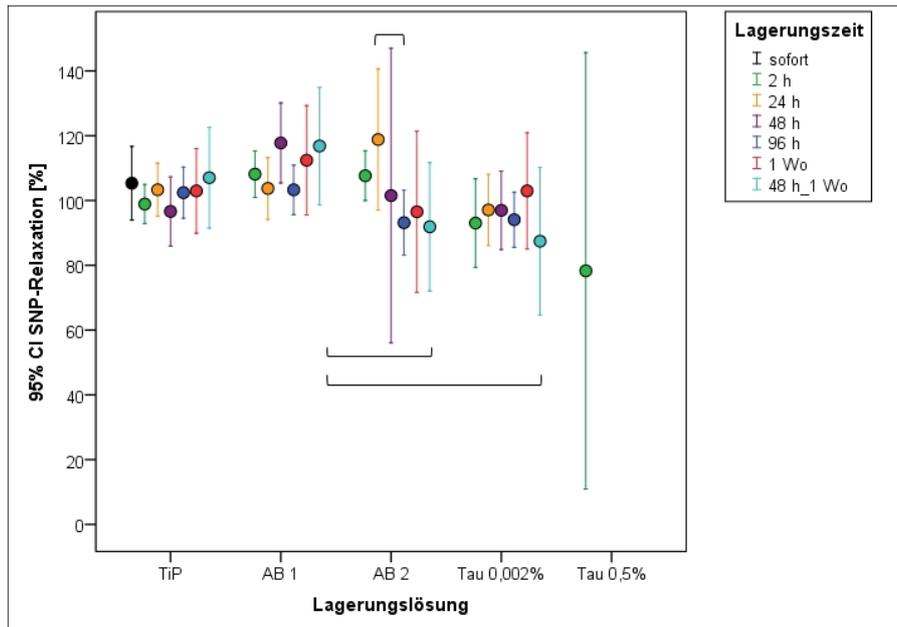


Abb. 4.12: Endothelunabhängige Vasodilatation durch SNP. Darstellung der maximalen Relaxation nach Lagerung in den unterschiedlichen Lagerungslösungen über unterschiedlichen Lagerungszeiten.

Tab. 4.9: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der endothelunabhängigen Relaxation durch SNP

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanzen	Hedge's g*
AB2	24h	96h	0,048	0,94
Lagerungszeit	Lagerungslösung	Lagerungslösung	Signifikanzen	Hedge's g*
48h_1Wo	AB1	AB2	0,040	0,76
		Tau 0,002%	0,012	0,87

Vergleich zwischen den Lagerungszeiten einer Lagerungslösung. Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

4.2.3 Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente durch Acetylcholin als Konzentrations-Wirkbeziehung

Das Relaxationsverhalten der Arteriensegmente konnte näher durch Konzentrations-Wirkbeziehungen untersucht werden. Durch die Erhöhung der ACh-Konzentration konnte eine Zunahme der Relaxation der Gefäßsegmente stufenweise detektiert werden. Es folgt ein Vergleich der gefitteten Parameter der relativen maximalen Relaxation (R_{max} [%]-Wert), des EC_{50} - und des ΔR -Wertes. Desweiteren wurden die Signifikanzen der Unterschiede für jede einzelne Konzentrationsstufe von ACh zwischen den Lagerungsgruppen berechnet. Um die Relevanz der Ergebnisse zu ermitteln erfolgte die Effektstärken-Berechnung nach Hedge's g^* .

Signifikante Unterschiede mit großer Effektstärke in der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch ACh-Stimulation konnten nur nach zwei Stunden Lagerungszeit für die Taurolidin 0,5%-Gruppe gegenüber den Lagerungsgruppen TiProtec[®], Antibiotikamixtur 1 und 2 detektiert werden (siehe Tabelle 4.11). Zwischen den anderen Lagerungsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede während der ACh-Konzentrationserhöhung.

Für die kurzen Lagerungszeiten folgt eine Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung:

Nach zwei Stunden Lagerungszeit lag die maximal erreichte Vasodilatation in der TiProtec[®]-Gruppe bei $63,03 \pm 6,51\%$, in der Antibiotikagruppe 1 bei $74,09 \pm 7,1\%$, in der Antibiotikagruppe 2 bei $64,64 \pm 11,39\%$ und in der Taurolidingruppe 0,002% bei $54,76 \pm 9,62\%$. In der Taurolidingruppe 0,5% hingegen betrug sie lediglich $42,24 \pm 11,81\%$.

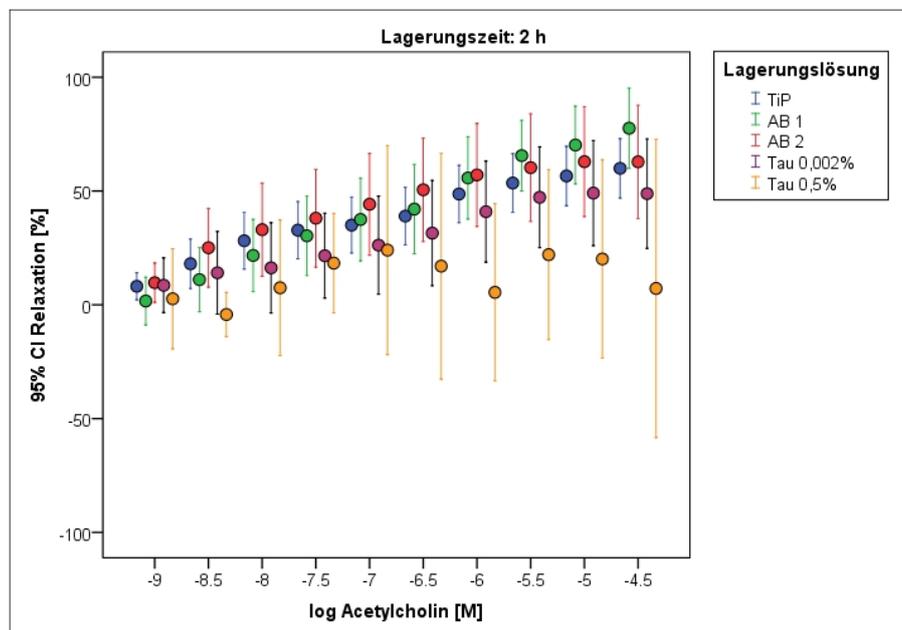


Abb. 4.13: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.10: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
2h	TiP	63,03	6,51	-6,06	1,27	1,98	0,65
2h	AB1	74,09	7,13	-6,05	0,70	1,31	0,36
2h	AB2	64,64	11,39	-5,88	1,99	2,91	1,52
2h	Tau 0,002%	54,76	9,62	-5,09	1,96	2,57	1,26
2h	Tau 0,5%	42,24	11,81	-22,58	14,60	5,12	2,84

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Tab. 4.11: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweise Konzentrationserhöhung von ACh nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lagerungszeit	$\log ACh$ [M]	LL	LL	Signifikanzen	Hedge's g^*
2h	-6	Tau 0,5%	AB1	0,038	1,39
			AB2	0,036	1,28
	-5	Tau 0,5%	AB1	0,040	1,20
	-4,5	Tau 0,5%	TiP	0,016	1,41
			AB1	0,001	1,86
			AB2	0,017	1,20

LL= Lagerungslösungen; negativ dekadische Logarithmus der ACh-Konzentration

($\log ACh$ [M]). Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt;

$g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

Schon nach 24 Stunden Lagerungszeit zeichnete sich eine abnehmende Tendenz der maximal erreichten Werte für die Vasodilatation in den Lagerungsgruppen ab. Lediglich die Werte in der TiProtec[®]-Gruppe (= $62,74 \pm 6,02\%$) blieben zu der Zeit noch unverändert. Interessant ist, dass sich die Werte der Antibiotikagruppen 1 (= $55,06 \pm 8,89\%$) und 2 (= $55,27 \pm 11,93\%$) zu dieser Lagerungsdauer angeglichen hatten (siehe Anhang, Abbildung B.3).

Nach 48 Stunden Lagerung nahm die Streuung der Daten zu. Bei den gefitteten Maximalwerten für die cholinerge Relaxation nach 48 Stunden zeigt sich in allen Lagerungsgruppen ein Absinken der endothel-abhängigen Vasodilatation. Die resultierenden Relaxationen waren für TiProtec[®] $45,10 \pm 8,74\%$, für den Antibiotikamix 1 $50,67 \pm 11,80\%$, für den Antibiotikamix 2 $29,89 \pm 12,50\%$ und für Taurolidin 0,002% $37,91 \pm 11,13\%$.

Bei der Auswertung der EC_{50} -Werte zeigte sich, dass zwischen den Lagerungszeiten 2 Stunden und 24 Stunden für die TiProtec[®]-Gruppe kaum eine Veränderung in der benötigten Konzentration von ACh

detektiert werden konnte. Zum Zeitpunkt von 48 Stunden lag der EC_{50} -Wert ($-\log 4,23$) außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs und konnte deshalb nicht gewertet werden.

Bei der Antibiotikagruppe 1 lag zwischen der Lagerungszeit von 2 Stunden und 24 Stunden eine deutliche Rechtsverschiebung vor. Hierbei wurde eine höhere Konzentration an ACh benötigt, um die halbmaximale Wirkkonzentration zu erreichen (siehe Tabellen 4.10 und 4.12). Nach 48 Stunden Lagerungszeit lag der EC_{50} -Wert ($-\log 3,81$) außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs.

Bei der Antibiotikagruppe 2 sank zwar die maximale Relaxationsantwort, jedoch blieb der EC_{50} -Wert zwischen den Messungen nach 2 und 48 Stunden Lagerung gleich. Nach 24 Stunden Lagerung lag der EC_{50} -Wert bei $-\log 7,52$ und deutete vermeintlich daraufhin, dass eine geringere Konzentration an ACh für die halbmaximale Vasodilatation benötigt wird. Allerdings war der Standardfehler ($SEM-EC_{50}=9,46$) hoch, so dass ein potenzieller Unterschied in der EC_{50} für die Antibiotikagruppe 2 nicht objektiviert werden konnte.

Nach einer Lagerung von 2 Stunden in Taurolidin in einer Konzentration von 0,002% ergab sich ein EC_{50} -Wert von $-\log 5,09$. Bereits ab 24 Stunden Lagerungszeit lag der EC_{50} -Wert ($= -\log 3,97$) außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs, was die hohe Variabilität der Daten widerspiegelt. Die Werte wurde daher verworfen, da die Daten nicht valide waren (siehe Anhang, Tabelle B.1). Gleiches galt für die Lagerungszeit von 48 Stunden. Auch hier konnte der EC_{50} -Wert ($= -\log 19,59$) nicht zuverlässig bewertet werden.

Die halbmaximale Wirkkonzentration von Taurolidin 0,5% konnte nicht gewertet werden, da der EC_{50} -Wert ($= -\log 22,58$) schon nach 2 Stunden Lagerungszeit außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches lag und der Standardfehler ($SEM-EC_{50}=14,60$) eine sehr große Streuung der Daten wiedergab.

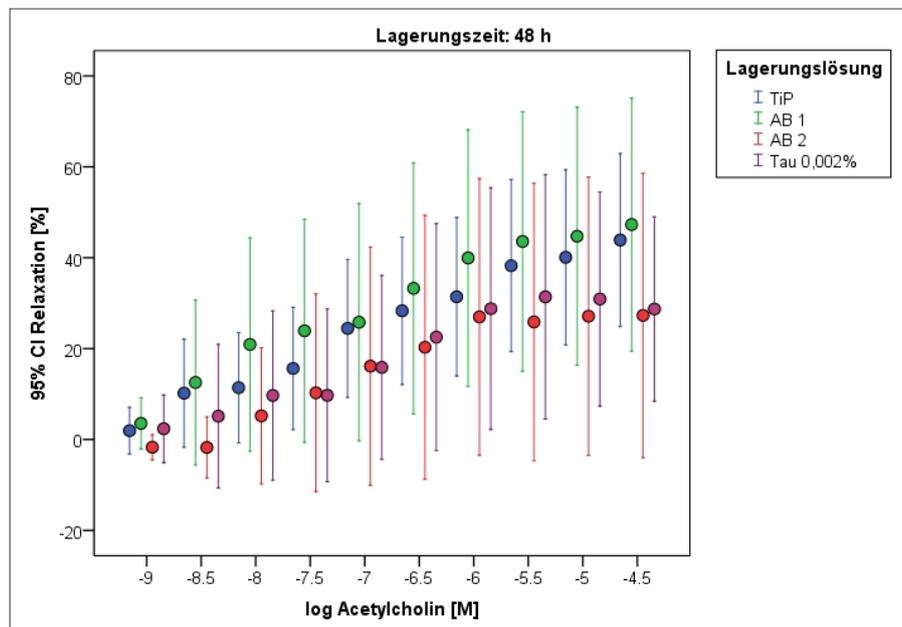


Abb. 4.14: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.12: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
48h	TiP	45,10	8,74	-4,23	1,75	2,13	0,90
48h	AB1	50,67	11,80	-3,81	3,11	2,56	1,25
48h	AB2	29,89	12,50	-5,88	1,99	2,91	1,52
48h	Tau 0,002%	37,91	11,13	-19,59	15,61	5,23	2,71

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Für die langen Lagerungszeiten folgt eine Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung:

Nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden sanken die durch Fitten ermittelten Werte der maximalen Vasodilatation bei der TiProtec®-Gruppe auf $34,30 \pm 7,35\%$, bei der Antibiotikagruppe 1 auf $32,01 \pm 9,26\%$ und bei der Antibiotikagruppe 2 auf $26,08 \pm 7,87\%$ (siehe Anhang, Tabelle B.2). Bei diesen drei Lagerungslösungen lagen die berechneten EC_{50} -Werte außerhalb des eingesetzten Konzentrationsbereiches. Sie erscheinen daher aufgrund der Streuungen der Daten nicht valide. Dennoch sind die maximal erreichten Relaxationswerte nach 96 Stunden Lagerung in den drei Gruppen signifikant unterschiedlich gegenüber denjenigen nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden (Maximalwerte der ACh-induzierten Vasodilatation aus den Messdaten, siehe Tabelle 4.8).

Der durch Fitten ermittelte Maximalwert für die cholinerge Relaxation lag nach Lagerung in Taurolidin 0,002% bei $54,30 \pm 8,97\%$. Er erreichte damit den höchsten Wert für diese Lagerungsgruppe. Allerdings unterschied sich der Mittelwert aus den Messdaten nicht signifikant gegenüber TiProtec® oder den beiden Antibiotikamixturen. Der EC_{50} -Wert lag bei $-\log 5,00$. Damit wurden hohe Konzentrationen an ACh benötigt, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen.

Nach einer Woche Lagerungszeit erreichte TiProtec® einen durch Fitten errechneten Maximalwert für die Relaxation von $33,04 \pm 7,80\%$ und die Antibiotikagruppe 1 $32,77 \pm 9,66\%$. Die Höchste prozentuale Relaxation lag bei der Antibiotikagruppe 2 mit $48,64 \pm 10,69\%$ vor. Allerdings betrug der EC_{50} -Wert für die Antibiotikagruppe 2 $-\log 4,87$, was anzeigt, dass eine hohe Konzentration an ACh benötigt wurde, um die halbmaximale Relaxation zu erreichen. Nach Lagerung in Taurolidin 0,002% betrug die maximale Vasodilatation $36,92 \pm 11,85\%$. Damit sank tendenziell dieser Wert für eine Woche Lagerung im Vergleich zu 96 Stunden ab. Es lag aber keine Signifikanz zwischen den Lagerungsgruppen nach 1 Woche Lagerungszeit vor.

Außerdem ist darauf hinzuweisen, dass mögliche Unterschiede in der halbmaximale Konzentration nach Lagerung in TiProtec®, Antibiotikagruppe 1 und Taurolidin 0,002% aufgrund der hohen Datenstreuung überdeckt waren (siehe Tabelle 4.13) und damit ist eine Beurteilung der EC_{50} -Werte nur eingeschränkt möglich.

Allerdings war die maximal erreichte Relaxationsantwort nach einer Woche Lagerung in TiProtec® und der Antibiotikamixtur 1 signifikant verschieden von den Maximalwerten nach einer Lagerungszeit von 2

Stunden (Maximalwerte für die ACh-induzierte Vasodilatation aus den Messdaten (siehe Tabelle 4.8).

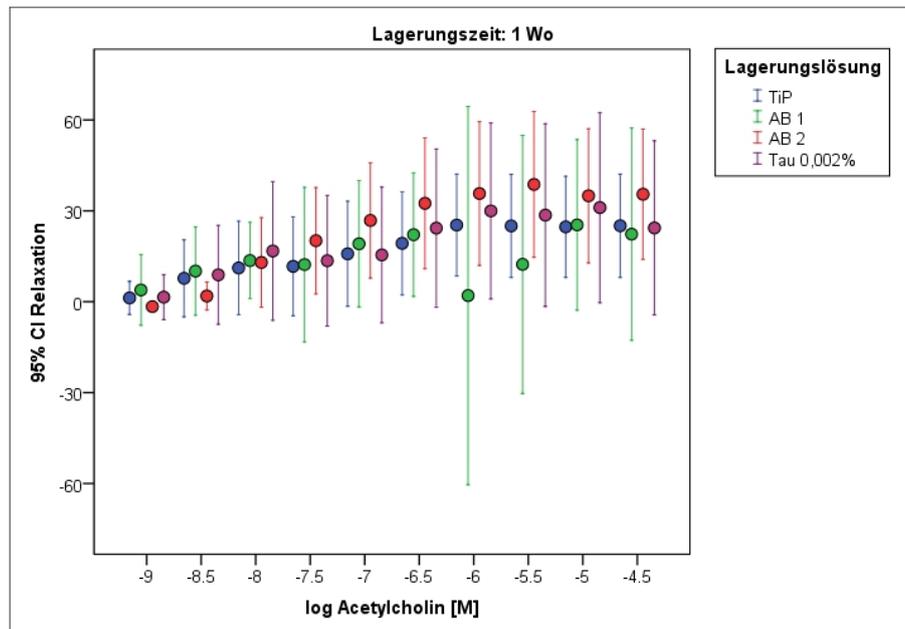


Abb. 4.15: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 1 Woche in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.13: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
1Wo	TiP	33,04	7,80	-4,86	6,10	3,51	1,99
1Wo	AB1	32,77	9,66	-18,15	14,47	5,39	2,57
1Wo	AB2	48,64	10,69	-4,87	2,47	2,28	1,34
1Wo	Tau 0,002%	36,92	11,85	-12,30	13,08	5,27	2,57

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Nach einer Lagerung von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung der Arteriensegmente in frische TiProtec®-Lösung für eine weitere Woche zeigte sich graphisch eine höhere Streuung der Fehlerbalkendiagramme als im Vergleich zu einer vollen Woche Lagerungszeit in einer antimikrobiell wirksamen Lösung (siehe Abbildungen 4.15 und 4.16).

Die durch Fitten ermittelten maximalen Werte der endothelabhängigen Vasodilatation betragen in der TiProtec® -Gruppe $32,98 \pm 7,48\%$, in der Antibiotikamixtur 1 $32,48 \pm 7,88\%$, in der Antibiotikamixtur 2 $27,43 \pm 10,53\%$ und in der Taurolidin 0,002%-Gruppe $35,43 \pm 10,11\%$.

Einen signifikanten Unterschied der Maximalwerte aus den Messdaten konnte nur in der Antibiotika-gruppe 1 im Vergleich zu zwei Stunden mit einer großen Effektstärke detektiert werden (siehe Tabelle 4.8).

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

Bei den berechneten EC_{50} -Werten lagen lediglich TiProtec® mit $-\log 4,55$ und Taurolidin 0,002% mit $-\log 5,83$ im gemessenen Konzentrationsbereich. Allerdings wiesen diese Werte eine hohe Streuung auf, was eine geringe Validität der Werte anzeigt.

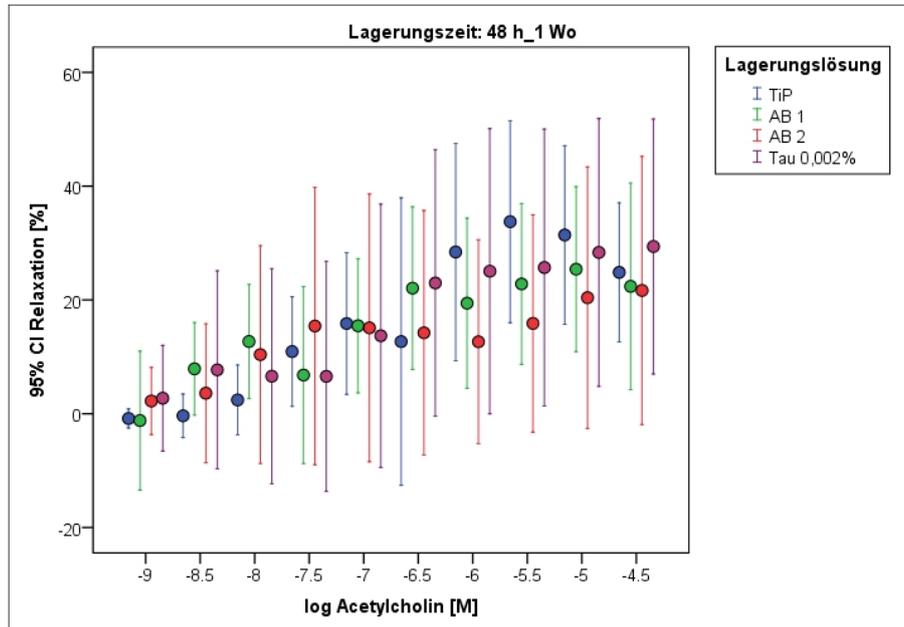


Abb. 4.16: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48_1Wo)

Tab. 4.14: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach einer Lagerungszeit von 48h_1Wo in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
48h_1Wo	TiP	32,98	7,48	-4,55	2,29	1,83	1,08
48h_1Wo	AB1	32,48	7,88	-3,26	3,80	2,87	1,33
48h_1Wo	AB2	27,43	10,53	-12,41	14,16	4,39	2,60
48h_1Wo	Tau 0,002%	35,43	10,11	-5,83	7,63	3,03	2,06

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung und nachfolgender Umlagerung für fünf Tage in TiProtec®

4.2.4 Evaluation des Relaxationsverhaltens der Gefäßsegmente durch SNP als Konzentrations-Wirkbeziehung

Wie im Abschnitt 4.2.3 wurde das Relaxationsverhalten der Arteriensegmente durch Konzentrations-Wirkbeziehungen untersucht. In diesem Kapitel wird auf das endothelunabhängige Vasodilatationsverhalten der Gefäßsegmente eingegangen.

Verglichen wurden die Parameter der relativen maximalen Relaxation (Max[%]-Wert), des EC₅₀- und des ΔR-Wertes. Desweiteren wurden signifikante Unterschiede für jede einzelne Konzentrationsstufe bei der Zugabe von SNP zwischen den Lagerungsgruppen berechnet. Um die Relevanz der Ergebnisse zu ermitteln erfolgte die Effektstärken-Berechnung nach Hedge's g*.

Signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungslösungen konnten nach zwei Stunden Lagerungszeit bei einer Konzentration von -log 8 zwischen der Antibiotikagruppe 1 und Taurolidin 0,002% analysiert werden (p= 0,013). Bei einer Lagerungsdauer von 24 Stunden gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Antibiotikagruppe 2 und Taurolidin 0,002% bei einer SNP-Konzentration von -log 6,5 (p= 0,029).

Interessant ist, dass bei einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage nur in TiProtec®-Lösung gehäuft signifikante Unterschiede zwischen den Antibiotikagruppen 1 und 2 analysiert werden konnten (siehe Tabelle 4.15). Ab einer Konzentration von -log 4 gab es noch einen signifikanten Unterschied zwischen der Antibiotikamixtur 1 und Taurolidin 0,002% (p= 0,049). Alle signifikanten Unterschiede wiesen eine große Effektstärke auf.

Tab. 4.15: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweise Konzentrationserhöhung von SNP bei unterschiedlichen Lagerungszeiten zwischen den unterschiedlichen Lösungen

Lagerungszeit	log SNP [M]	LL	LL	Signifikanzen	Hedge's g*
2h	-8	AB1	Tau 0,002%	0,013	0,94
24h	-6,5	AB2	Tau 0,002%	0,029	0,86
48h_1Wo	-7,5	AB1	AB2	0,006	1,10
	-7	AB1	AB2	0,011	0,97
	-6,5	AB1	AB2	0,005	1,19
	-6	AB1	AB2	0,002	1,22
	-5,5	AB1	AB2	0,016	1,00
	-5	AB1	AB2	0,039	0,90
	-4	AB1	Tau 0,002%	0,048	0,86

LL = Lagerungslösungen; negativ dekadischer Logarithmus der SNP-Konzentrationen (log SNP [M]). Effektstärke nach Hedge's g* = g* < 0,5 = kleiner Effekt; g* 0,5–0,8 = mittlerer Effekt; g* > 0,8 = großer Effekt.

Für die kurzen Lagerungszeiten können folgende Aussagen zu den Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei SNP-Stimulation gemacht werden:

Bei allen Lagerungslösungen konnten durch Kurvenfitten hohe Werte für die maximale endothelunabhängige Vasodilatation nach 2 Stunden Lagerungszeit ermittelt werden (siehe Tabelle 4.16). Die höchsten Maximalwerte wurden in der Antibiotikagruppe 1 ($= 108,13 \pm 3,28\%$) und 2 ($= 107,65 \pm 3,58\%$) erreicht. Die TiProtec[®]-Gruppe lag bei $98,91 \pm 2,94\%$ und die Taurolidin 0,002%-Gruppe bei $93,03 \pm 6,27\%$. Die Taurolidin 0,5%-Gruppe erreichte nur einen Maximalwert von $78,29 \pm 21,16\%$ und war im Vergleich mit den anderen Gruppen tendenziell am niedrigsten. Bei der Auswertung der EC₅₀-Werte zeigte sich, dass die Arteriensegmente nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden in beiden Antibiotikamixturen und in der TiProtec[®]-Lösung nur eine sehr geringe Konzentration an SNP benötigten, um die halbmaximale Konzentration zu erreichen (siehe Tabelle 4.16). Die Gefäßsegmente der Taurolidin 0,002%-Gruppe erreichten mit $-\log 7,39$ die halbmaximale Wirkkonzentration und benötigten damit eine höhere Konzentration an SNP als die anderen drei Lagerungslösungen. Wie bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei ACh-Stimulation lag der EC₅₀-Wert bei der Taurolidin 0,5%-Gruppe außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches. Der hohe Standardfehler (SEM-EC₅₀ = 11,40) gab eine hohe Streuung wieder und damit waren die Werte nicht valide.

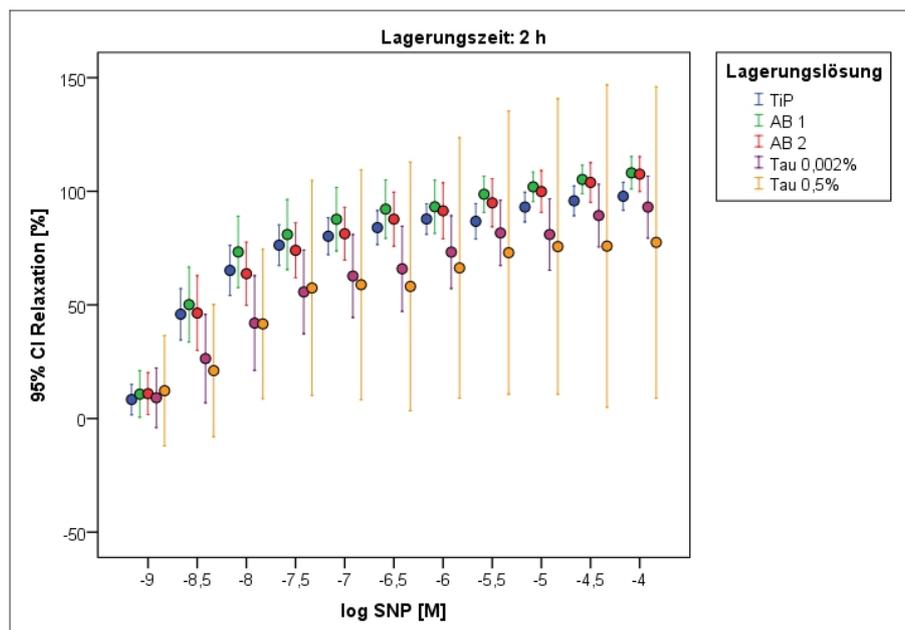


Abb. 4.17: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.16: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
2h	TiP	98,91	2,94	-8,46	0,06	0,40	0,07
2h	AB1	108,13	3,38	-8,45	0,09	0,42	0,11
2h	AB2	107,65	3,58	-8,30	0,12	0,64	0,15
2h	Tau 0,002%	93,03	6,27	-7,39	0,64	1,33	0,50
2h	Tau 0,5%	78,29	21,16	-11,69	11,40	4,94	2,58

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden (siehe Anhang, Tabelle B.3) gab es nur geringe Unterschiede bei den durch Fitten ermittelten maximalen Vasodilatationswerten. Die Antibiotikagruppe 2 wies gegenüber der Taurolidin 0,002%-Gruppe bei der SNP-Konzentration von $-\log 6,5$ einen signifikanten Unterschied auf (siehe Tabelle 4.15).

Die TiProtec[®]-Lösung erreichte einen Maximalwert von $103,31 \pm 3,98\%$, die Antibiotikagruppe 1 lag bei $103,73 \pm 4,33\%$ und die Taurolidin 0,002%-Gruppe stieg leicht auf $97,09 \pm 4,93\%$. Die Antibiotikagruppe 2 erreichte den höchsten Maximalwert von $118,82 \pm 9,90\%$. Die Kurvenfitberechnung ergab für EC_{50} -Werte der vier Lagerungslösungen nur sehr geringe Abweichungen im Vergleich zwischen zwei und 24 Stunden Lagerungszeit.

Gleichbleibend hohe Maximalwerte für die endothelunabhängige Vasodilatation wurden nach 48 Stunden Lagerungszeit registriert. Die Werte für die TiProtec[®]-Gruppe erreichten $96,62 \pm 5,03\%$, die Antibiotikagruppe 1 lag bei $117,77 \pm 5,62\%$, die Antibiotikagruppe 2 bei $101,52 \pm 18,59\%$ und die Taurolidin 0,002%-Gruppe erreichte einen Maximalwert von $96,97 \pm 5,35\%$.

Nach 48 Stunden Lagerungszeit ergab die Auswertung der EC_{50} -Werte der Lagerungsgruppen, dass höhere Konzentrationen an SNP benötigt wurden, um eine halbmaximale Vasodilatation zu erreichen (siehe Tabelle 4.17). Allerdings war der Standardfehler in der Antibiotikagruppe 2 mit $SEM-EC_{50} = 3,53$ hoch, sodass die Bewertung des EC_{50} bei dieser Lagerungszeit nur bedingt möglich war.

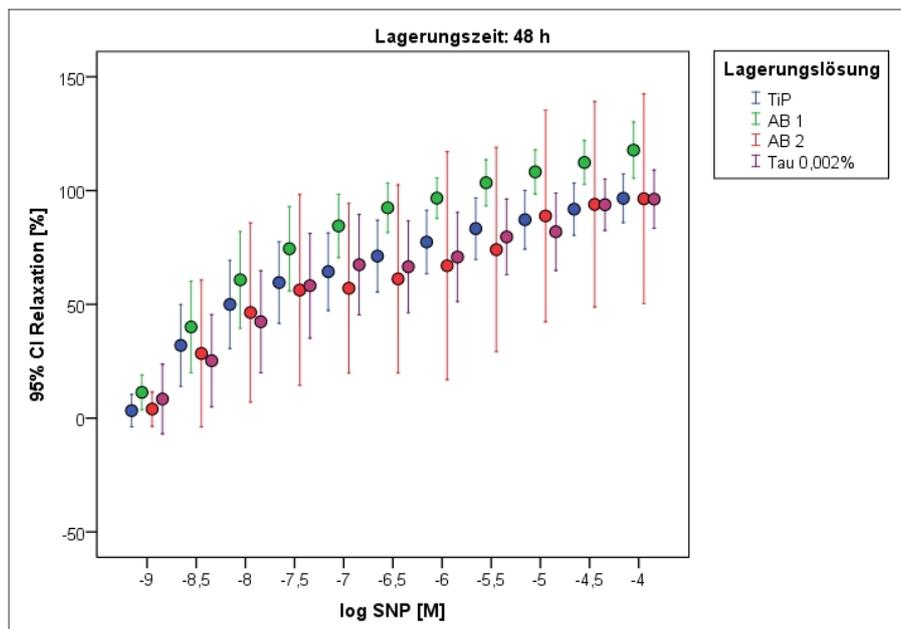


Abb. 4.18: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.17: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten SNP Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
48h	TiP	96,62	5,03	-7,54	0,43	0,99	0,35
48h	AB1	117,77	5,62	-7,83	0,18	0,80	0,19
48h	AB2	101,52	18,59	-6,69	3,53	2,26	1,69
48h	Tau 0,002%	96,97	5,35	-6,92	0,75	1,53	0,59

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Für die langen Lagerungszeiten können folgende Aussagen zu den Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei SNP-Stimulation gemacht werden:

Nach einer Lagerungsdauer von 96 Stunden erreichten die durch Fitten ermittelten Werte der maximalen Vasodilatation unter SNP-Stimulation ähnliche Werte wie nach einer Lagerungsdauer von 24 und 48 Stunden (siehe Tabellen 4.17, B.3 und B.4). Die Maximalwerte aus den Messdaten für die Vasodilatation der Antibiotikamixtur 2 unterschieden sich signifikant zwischen 24 und 96 Stunden ($p= 0,048$) und wiesen eine große Effektstärke auf (siehe Tabelle 4.9). Interessant ist, dass nach 96 Stunden bei allen vier Lagerungsgruppen eine ähnlich niedrige Konzentration an SNP benötigt wurde, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen wie nach 2 oder 24 Stunden Lagerungszeit (siehe Tabellen 4.16, B.3 und B.4).

Auch nach einer Lagerungszeit von einer Woche konnten durch Fitten der Daten gleichbleibend ho-

he Maximalwerte für die SNP-induzierte Vasodilatation erreicht werden. Außerdem wurden weiterhin nur niedrige Konzentrationen an SNP benötigt, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen (siehe Tabelle 4.18).

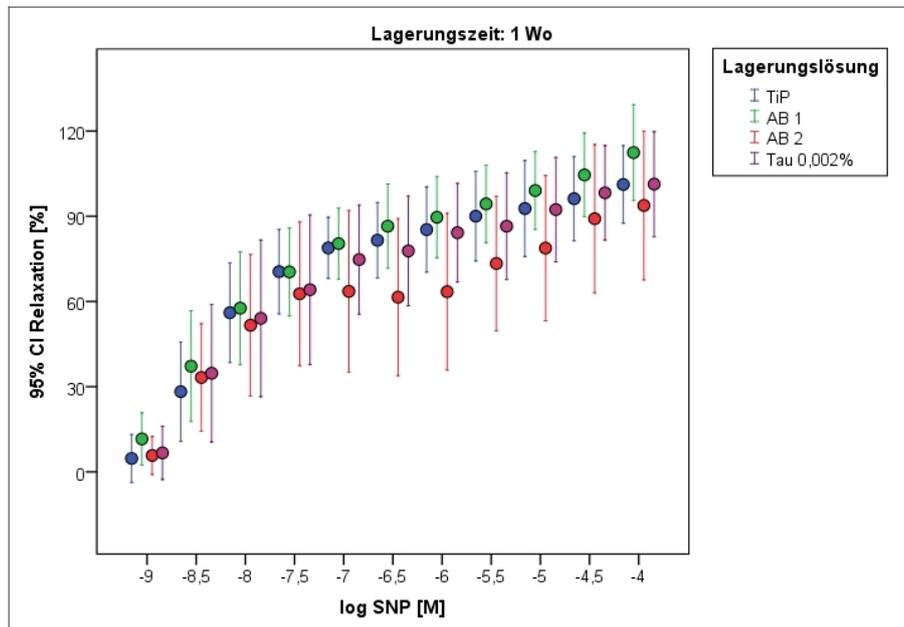


Abb. 4.19: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 1 Woche in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. 4.18: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
1Wo	TiP	102,95	6,13	-8,00	0,13	0,50	0,12
1Wo	AB1	112,34	8,30	-8,00	0,26	0,79	0,29
1Wo	AB2	96,51	11,30	-7,64	0,89	1,51	0,97
1Wo	Tau 0,002%	102,95	7,92	-7,99	0,30	0,82	0,33

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM).

Nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in Ti Protec[®]-Lösung konnten signifikante Unterschiede zwischen den Maximalwerten der Messdaten für die Vasodilatation zwischen der Antibiotikamixtur 1 und 2 detektiert werden ($p=0,040$). Dieses Ergebnis wies allerdings nur eine mittlere Effektstärke auf. Ein weiteren signifikanten Unterschied der Maximalwerte aus den Messdaten für die endothelunabhängige Vasodilatation konnte für die Gefäßsegmente der Antibiotikamixtur 1 gegenüber den Gefäßsegmenten der Taurolidin 0,002%-Gruppe berechnet werden ($p=0,012$). Dieses Ergebnis wies eine große Effektstärke auf (siehe Tabelle 4.9). Diese signifikanten Unterschiede zwischen der Antibiotikamixtur 1 und 2 waren auch

bei den Kurvenverläufen ab einer SNP-Konzentration von $-\log 7,5$ bis $-\log 5$ zu detektieren. Allerdings zeigte sich zwischen der Antibiotikamixtur 1 und Taurolidin 0,002% nur bei einer SNP-Konzentration von $-\log 4$ einen signifikanten Unterschied. Alle signifikanten Ergebnisse wiesen eine große Effektstärke auf (siehe Tabelle 4.14)

Die durch Fitten ermittelten Maximalwerte erreichten bei der TiProtec[®]-Gruppe $107,04 \pm 7,38\%$, bei der Antibiotikamixtur 1 $116,83 \pm 8,51\%$, bei der Antibiotikagruppe 2 $91,88 \pm 8,75\%$ und bei der Taurolidin 0,002%-Gruppe $87,42 \pm 9,86\%$.

Im Vergleich zu einer Woche Lagerungszeit benötigte die Antibiotikagruppe 2 eine höhere Konzentration an SNP, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen. Die anderen drei Lagerungsgruppen erreichten weiterhin mit nahezu gleichbleibend niedrigen Konzentrationen die halbmaximale Vasodilatation.

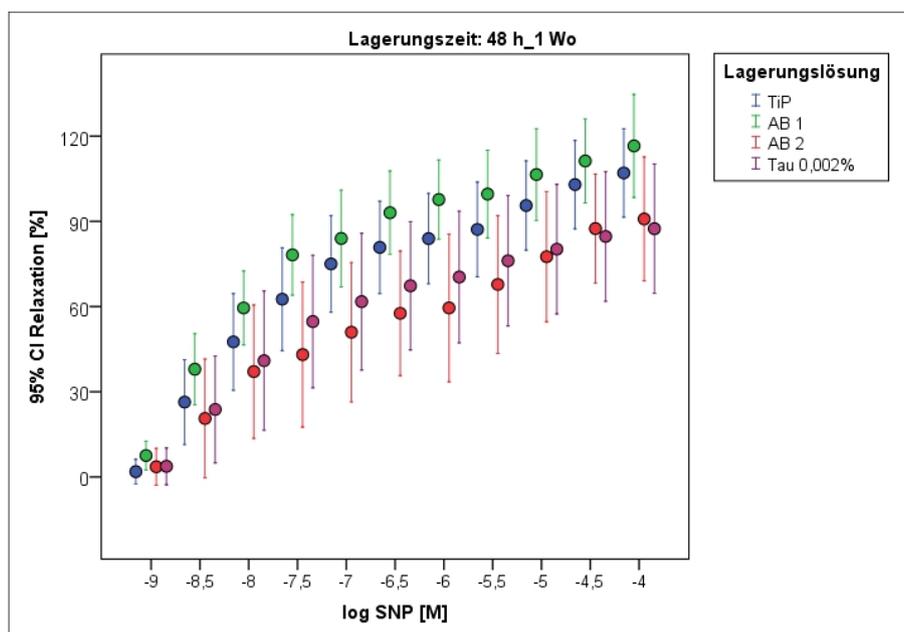


Abb. 4.20: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei stufenweiser Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung (48_1Wo).

Tab. 4.19: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach einer Lagerungszeit von 48h_1Wo in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
48h_1Wo	TiP	107,04	7,38	-7,80	0,20	0,71	0,20
48h_1Wo	AB1	116,83	8,51	-8,09	0,14	0,66	0,15
48h_1Wo	AB2	91,88	8,75	-6,70	0,82	1,63	0,57
48h_1Wo	Tau 0,002%	87,42	9,86	-7,44	0,61	1,05	0,51

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in der angegebenen Dekontaminationslösung und nachfolgender Umlagerung für fünf Tage in TiProtec®

4.2.5 Relaxationsverhalten der einzelnen Substanzen nach 24h Lagerung

Wie in Abschnitt 4.1.4 für die Kontraktion, so wird in diesem Kapitel die Vasorelaxation der Arteriensegmente in TiProtec®-Lösungen mit Einzelsubstanzen der Dekontaminationslösungen beschrieben. Die Lagerungszeit hatte eine Dauer von 24 Stunden. Verglichen wurden die Substanzen Metronidazol (M), Fluconazol (F), Clindamycin (C), Gentamicin (G), Staphylex (S) und Itraconazol (I). Zuerst werden die maximalen endothelabhängigen- und die endothelunabhängigen Relaxationsantworten dargestellt. Die Maximalwerte wurden aus Mittelwertberechnungen aus den Messdaten ermittelt.

Danach wird die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von ACh und SNP für die Einzelsubstanzen eruiert. Tabelle 4.20 zeigt wieder eine Übersicht über die Anzahl der verwendeten Arteriensegmente bei den einzelnen Substanzen in TiProtec®-Lösung.

Tab. 4.20: Anzahl der verwendeten Arteriensegmente für die einzelnen Substanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden

LZ / Substanz	TiP+M	TiP+F	TiP+C	TiP+G	TiP+S	TiP+I
24h	9	6	7	7	8	7

LZ = Lagerungszeit

Abbildungen 4.21 und 4.22 zeigen die maximalen Werte für die Vasodilatation der Einzelsubstanzen unter ACh und SNP. Statistisch gibt es sowohl bei der endothelabhängigen- wie auch bei der endothelunabhängigen Vasodilatation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungslösungen.

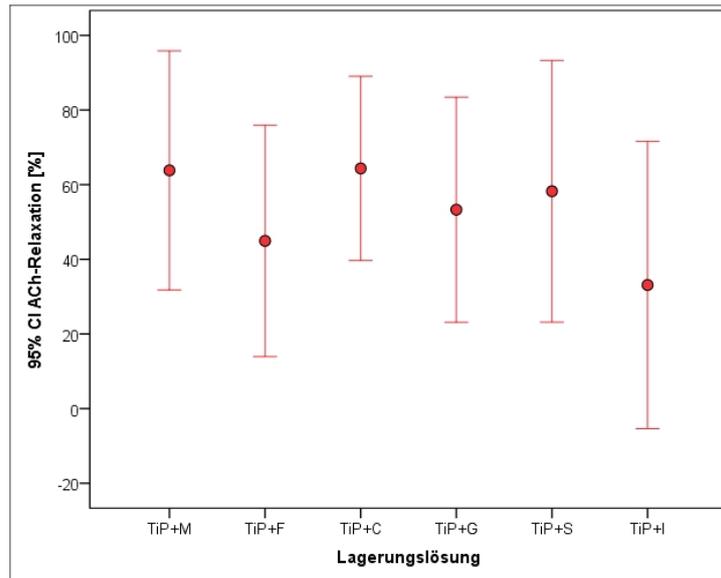


Abb. 4.21: Vergleich der Maximalwerte der Vasodilatation unter ACh nach 24h Lagerung in TiProtec®-Lösung mit Zusatz einer Einzelsubstanz

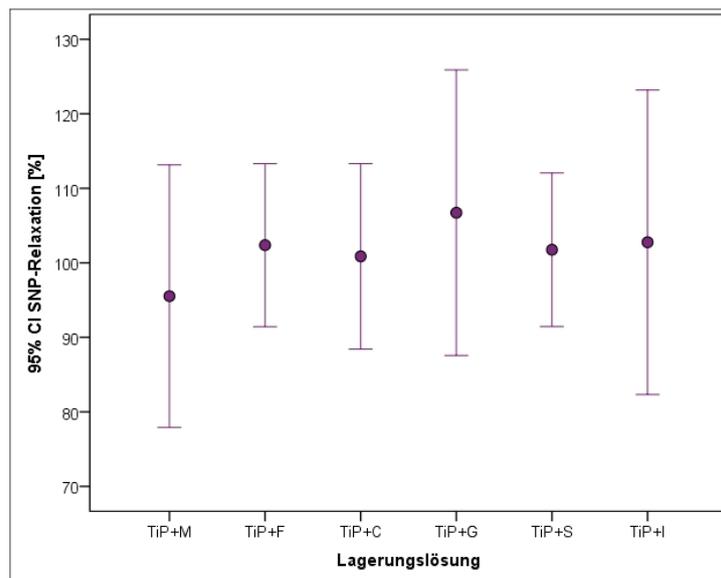


Abb. 4.22: Vergleich der Maximalwerte der Vasodilatation unter SNP nach 24h Lagerung in TiProtec®-Lösung mit Zusatz einer Einzelsubstanz

Bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von ACh gab es zwei signifikante Unterschiede nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden. Die Unterschiede wurden zwischen Clindamycin und Itraconazol bei einer Konzentration von $-\log 6$ ($p= 0,048$) und $-\log 5,5$ ($p= 0,047$) berechnet (siehe Tabelle 4.22).

Die durch Fitten ermittelten Maximalwerte für die Vasodilatation betragen bei Clindamycin $67,67 \pm 11,42\%$, für Gentamicin mit $65,23 \pm 13,19\%$, für Metronidazol bei $63,83 \pm 13,89\%$, für Staphylex

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

58,24 ± 14,82%, für Fluconazol 48,53 ± 17,20% und für Itraconazol 33,12 ± 15,73%.

Bei den Konzentrationen für die halbmaximale Vasodilatation konnten lediglich Metronidazol mit $-\log 5,78 \pm 1,20$ und Clindamycin mit $-\log 5,96 \pm 1,35$ eingeschränkt gewertet werden, da die Standardfehler und damit die Streuung dieser Werte relativ hoch war. Bei diesen beiden Substanzen waren tendenziell hohe Konzentrationen an ACh nötig, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen. Bei allen anderen Einzelsubstanzen lagen die EC_{50} -Werte teilweise außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches und die Streuung der Werte war sehr hoch. Damit waren die Ergebnisse für die Abschätzung der EC_{50} -Werte nicht valide.

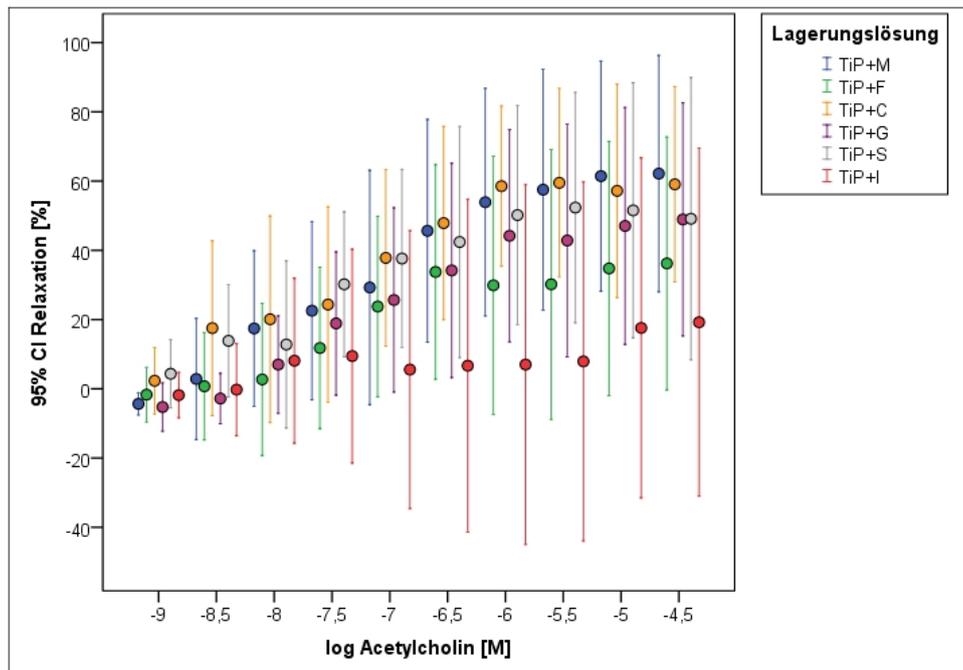


Abb. 4.23: Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der endothelabhängigen Relaxationsantwort der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden

Tab. 4.21: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP+M	63,83	13,89	-5,78	1,20	1,26	0,71
TiP+F	48,53	17,20	-10,32	12,62	4,24	2,50
TiP+C	67,67	11,42	-5,96	1,35	1,54	0,86
TiP+G	65,23	13,19	-5,25	2,09	1,61	1,05
TiP+S	58,24	14,82	-9,12	10,19	4,49	2,48
TiP+I	33,12	15,73	-14,71	15,08	4,05	3,13

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung

Tab. 4.22: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der stufenweisen Konzentrationserhöhung von ACh nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

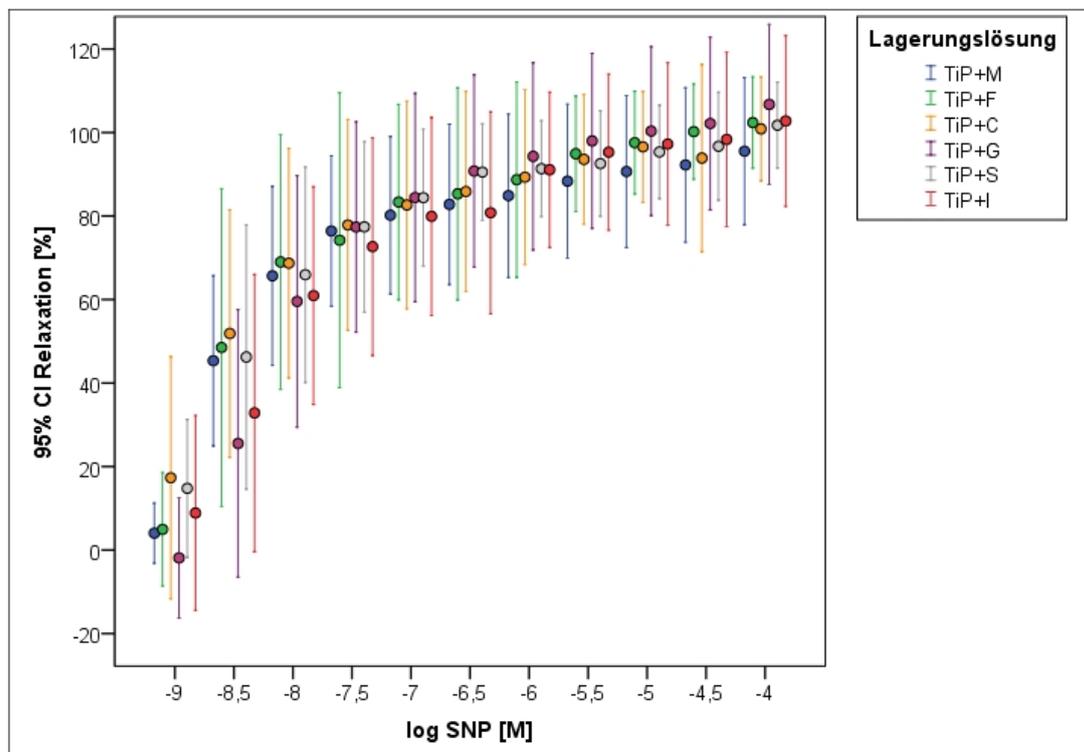
log ACh [M]	Substanzgruppe	Substanzgruppe	Signifikanzen	Hedge's g*
-6	TiP+C	TiP+I	0,048	0,85
-5,5	TiP+C	TiP+I	0,047	1,08

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung

Dagegen gab es bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei SNP-Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Maximalwerten aus den Messdaten der Einzelsubstanzen nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden.

Die tendenziell höchsten durch Fitten ermittelten Maximalwerte für die endothelunabhängige Vasodilatation erreichte die Gruppe mit Gentamicin mit $106,72 \pm 7,83\%$. Die niedrigste erreichte maximale Vasodilatation erreichten Gefäßsegmente, welche in Metronidazol gelagert wurden ($95,52 \pm 7,64\%$).

Alle Einzelsubstanz-Gruppen erreichten einen ähnlichen EC_{50} -Wert. Dieser lag zwischen $-\log 8,05$ und $-\log 8,43$ (siehe Tabelle 4.23). Damit wurden in allen Gruppen nur geringe Konzentrationen an SNP benötigt, um die halbmaximale Vasodilatation der Arteriensegmente zu erreichen.

**Abb. 4.24:** Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der endothelunabhängigen Relaxationsantwort der Einzelsubstanzen in TiProtec®-Lösung bei einer Lagerungszeit von 24 Stunden

Tab. 4.23: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP+M	95,52	7,64	-8,37	0,15	0,42	0,18
TiP+F	102,37	4,26	-8,13	0,41	0,94	0,56
TiP+C	100,87	5,09	-8,34	0,24	0,61	0,36
TiP+G	106,72	7,83	-8,15	0,13	0,44	0,14
TiP+S	101,75	4,36	-8,43	0,20	0,61	0,32
TiP+I	102,76	8,35	-8,05	0,25	0,75	0,30

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Einzelsubstanzen in TiProtec[®]-Lösung

4.2.6 Inhibition der Einzelkomponenten der endothelabhängigen Relaxation

Die endothelabhängige Vasorelaxation durch ACh-Stimulation wird durch verschiedene Botenstoffe reguliert. In diesem Kapitel wurde untersucht, ob die eingesetzten Dekontaminationslösungen die verschiedenen Signalwege der ACh-induzierten Vasodilatation beeinflussen.

Zur Identifizierung der Signalwege wurden für die Botenstoffe wie Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und EDHF bzw. Epoxyeicosatriensäuren (EET) verschiedene Inhibitoren verwendet. L-NMMA (N^G - Monomethyl-L-Arginin=L) hemmt die NO-Synthase (Palmer et al., 1988), Indomethacin (I) hemmt nichtselektiv die Cyclooxygenase 1 und 2 (Hinz & Brune, 1999), Apamin (A) hemmt K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (Brayden, 1996) und Charybdotoxin (C) hemmt unspezifisch K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer und großer Leitfähigkeit (Brayden, 1996).

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet, deren Inhibitoren kumulativ zugesetzt waren. Inhibitorgruppe 1 enthielt ausschließlich L-NMMA, Inhibitorgruppe 2 L-NMMA und Indomethacin und Inhibitorgruppe 3 alle vier Inhibitoren: L-NMMA, Indomethacin, Apamin und Charybdotoxin. Diese Versuche wurden durchgeführt, wenn eine ausreichende Anzahl von Gefäßringen aus dem Explantat gewonnen werden konnten. Es wurden anhand der Messdaten die Maximalwerte der Messdaten der Relaxationen und die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation untersucht.

Tab. 4.24: Anzahl der verwendeten Arteriensegmente in der jeweiligen Inhibitorgruppe

Inhibitorgruppe 1 (L-NMMA)							
LL / LZ	sofort	2h	24h	48h	96h	1Wo	48h_1Wo
TiP	5	6	-	6	-	-	8
AB1	-	7	-	3	-	-	5
AB2	-	-	-	-	-	-	-
Tau 0,5%	-	3	-	-	-	-	-
Inhibitorgruppe 2 (L-NMMA + Indomethacin)							
LL / LZ	sofort	2h	24h	48h	96h	1Wo	48h_1Wo
TiP	5	8	6	6	4	5	8
AB1	-	6	-	3	-	1	5
AB2	-	3	5	-	4	4	-
Tau 0,5%	-	3	-	-	-	-	-
Inhibitorgruppe 3 (L-NMMA + Indomethacin + Apamin + Charybdotoxin)							
LL / LZ	sofort	2h	24h	48h	96h	1Wo	48h_1Wo
TiP	5	8	6	6	4	5	8
AB1	-	6	-	3	-	1	5
AB2	-	3	5	-	4	4	-
Tau 0,5%	-	3	-	-	-	-	-

LL = Lagerungslösung, LZ = Lagerungszeit,
48h_1Wo = Lagerung der Gefäßsegmente 48 Stunden in
einer Dekontaminationslösung mit anschließender
Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung

In den Inhibitorgruppen 1 und 2 gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Maximalwerten für die endothelabhängige Vasodilatation zwischen den Lagerungslösungen oder den Lagerungszeiten (siehe Abbildungen 4.25 und 4.26).

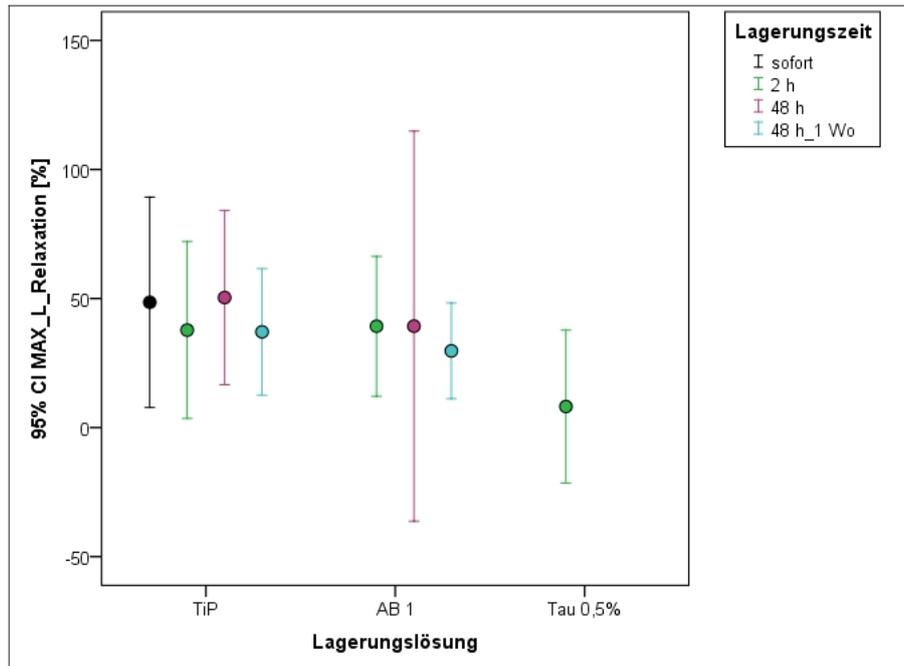


Abb. 4.25: Maximalwerte für die endothelabhängige Vasorelaxation bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 1 (L= L-NMMA)

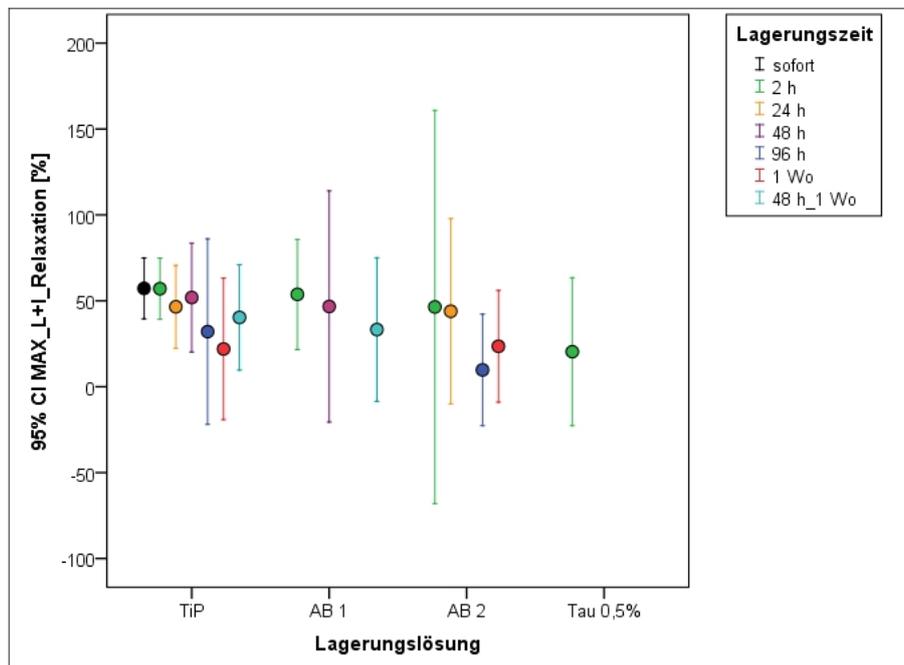


Abb. 4.26: Maximalwerte für die endothelabhängige Vasorelaxation bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 2 (L= L-NMMA; I= Indomethacin)

Dagegen gab es signifikante Unterschiede mit großer Effektstärke bei der maximalen Vasorelaxation in der Ti Protec[®]-Gruppe zwischen den Lagerungszeiten durch die Inhibitorgruppe 3 (siehe Tabelle 4.25, Abbildung 4.27).

Die Maximalwerte für die ACh-induzierte Vasodilatation unterschieden sich zwischen 24 Stunden und 48 Stunden Lagerung in TiProtec[®] mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung ($p=0,023$) (48h_1Wo).

Die meisten signifikanten Unterschiede wurden bei einer Lagerungszeit von 48 Stunden im Vergleich mit Sofort-Messungen ($p=0,029$), mit 2 Stunden ($p=0,047$), mit 24 Stunden ($p=0,001$), mit 96 Stunden ($p=0,004$) und mit 1 Woche ($p=0,001$) berechnet. Desweiteren gab es in der TiProtec[®]-Gruppe signifikante Unterschiede zwischen 96 Stunden und 48h_1Wo ($p=0,045$) sowie zwischen 1 Woche und 48h_1Wo ($p=0,022$).

Interessanterweise gab es bei der Lagerungszeit von 48 Stunden signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungslösungen TiProtec[®] und der Antibiotikagruppe 1 ($p=0,013$). Auch dieses Ergebnis wies eine große Effektstärke auf.

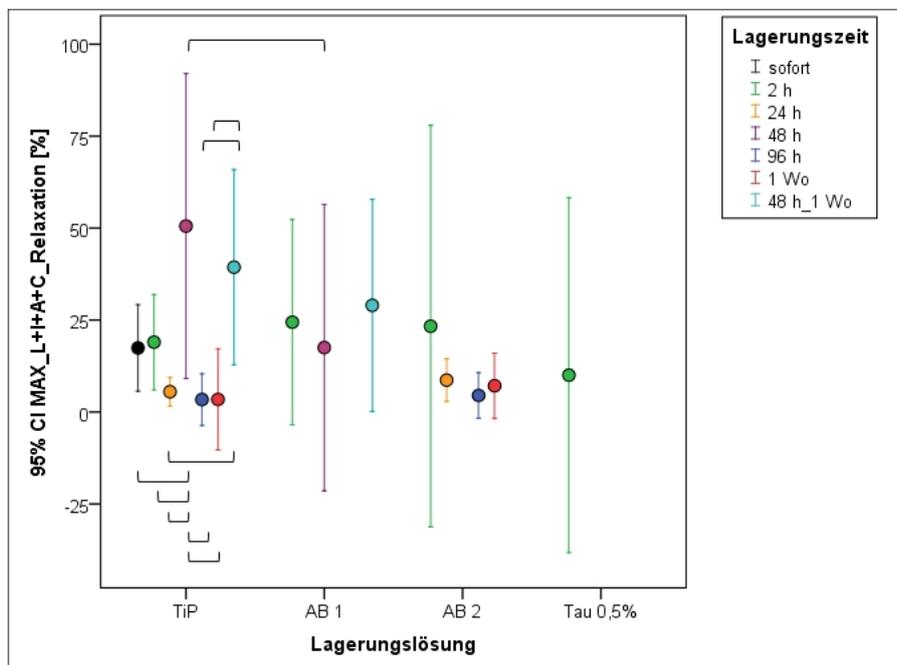


Abb. 4.27: Maximale Vasorelaxation der Inhibitorgruppe 3 (L= LNMMA, I= Indomethacin, A= Apatin, C= Charybdotoxin)

Tab. 4.25: Signifikante Unterschiede und Effektstärken der Inhibitoren-Gruppe 3

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanzen	Hedge´s g*
TiP	24h	48h_1Wo	0,023	1,30
		48h	0,029	1,12
	96h	2h	0,047	1,05
		24h	0,001	1,48
		96h	0,004	1,36
		1Wo	0,001	1,42
		48h_1Wo	0,045	1,24
		48h_1Wo	0,022	1,28
Lagerungszeit	Lagerungslösung	Lagerungslösung	Signifikanzen	Hedge´s g*
48h	TiP	AB1	0,013	0,85

Verglichen werden die Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungslösung sowie Lagerungslösungen zu einer bestimmten Lagerungszeit. Effektstärke nach Hedge´s $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

Beim Vergleich der Konzentration-Wirkungsbeziehungen der **Inhibitorgruppe 1** gab es signifikante Unterschiede mit einer großen Effektstärke nur während der Lagerungszeit von 2 Stunden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Lagerungszeiten 48 Stunden und 48 Stunden mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] berechnet werden.

Nach 2 Stunden Lagerungszeit unterschieden sich bei einer Konzentration von $-\log 7$ die Taurolidingruppe 0,5% zum einen von der TiProtec[®]-Lösung ($p= 0,015$) und zum anderen von der Antibiotikagruppe 1 ($p= 0,017$) signifikant. Bei einer ACh- Konzentration von $-\log 5$, ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Taurolidin 0,5% und der Antibiotikagruppe 1 ($p= 0,023$) (siehe Tabelle 4.27).

Die durch Fitten ermittelten Maximalwerte der ACh- induzierte Vasodilatation erreichten nach 2 Stunden in der TiProtec[®]-Gruppe $48,09 \pm 10,32\%$, in der Antibiotikagruppe 1 $42,68 \pm 12,45\%$ und in der Taurolidin 0,5%- Gruppe $11,61 \pm 12,25\%$. Die durch Kurvenfitting errechneten EC_{50} -Werte für die halbmaximale Vasodilatation befanden sich für alle drei Lagerungslösungen außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches und damit waren die EC_{50} -Werte nicht valide.

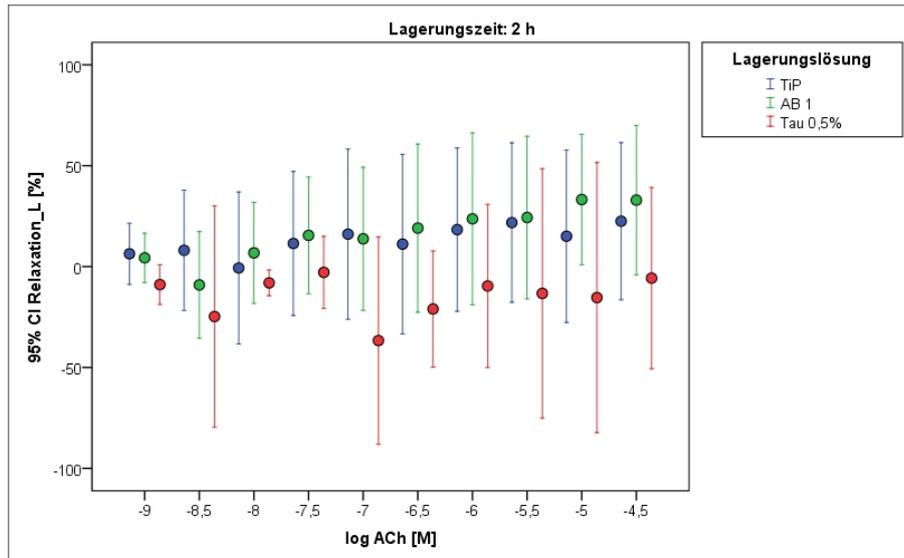


Abb. 4.28: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden

Tab. 4.26: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	48,09	10,32	-18,06	15,26	5,10	2,68
AB1	42,68	12,45	-10,82	13,08	4,28	2,53
Tau 0,5%	11,61	12,25	-9,89	11,76	3,33	3,10

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 1

Tab. 4.27: Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 1

Lagerungszeit	log ACh [M]	Lösung	Lösung	Signifikanzen	Hedge's g^*
2h	-7	Tau 0,5%	TiP	0,015	1,27
			AB1	0,017	1,26
	-5	Tau 0,5%	AB1	0,023	1,18

Vergleich der Lagerungslösungen zu einer Lagerungszeit von 2 Stunden bei steigenden ACh-Konzentrationen (log ACh [M]). Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden ergaben die gefitteten Maximalwerte von TiProtec®

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

50,36 ± 13,14% und für die Antibiotikagruppe 1 39,28 ± 17,47%. Auch hier können die berechneten EC₅₀-Werte für die halbmaximale Vasodilatation nicht valide gewertet werden, da die EC₅₀-Werte außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches lagen.

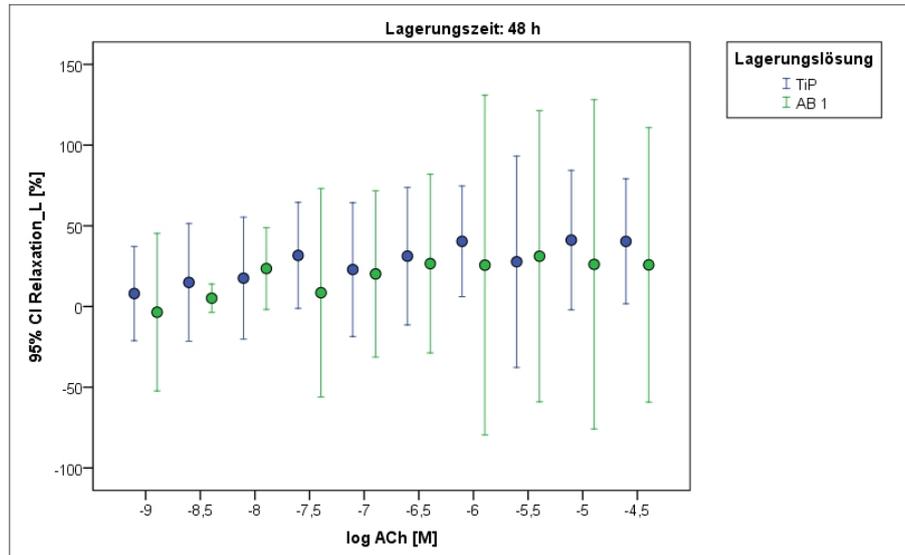


Abb. 4.29: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden

Tab. 4.28: R_{max}-, EC₅₀- und ΔR-Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R _{max} [%]	SEM-R _{max}	-log EC ₅₀ [M]	SEM-EC ₅₀	ΔR	SEM-ΔR
TiP	50,36	13,14	-15,36	13,95	5,33	2,52
AB1	39,28	17,57	-15,05	14,14	5,06	2,59

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 1

Nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] reduzierten sich die durch Fitten ermittelten Maximalwerte in der Inhibitorgruppe 1 bei TiProtec[®] auf 37,07 ± 10,37% und bei der Antibiotikamixtur 1 auf 29,72 ± 6,68%. Wie bei den anderen Lagerungszeiten, kann auch hier der EC₅₀-Wert aus den genannten Gründen nicht valide gewertet werden.

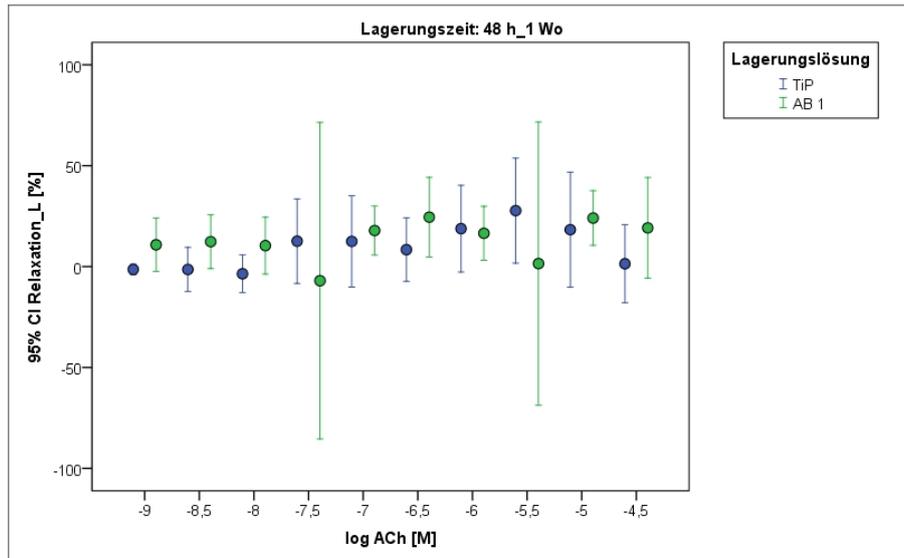


Abb. 4.30: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in Ti Protec[®]-Lösung (48h_1Wo)

Tab. 4.29: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	37,07	10,37	-16,07	14,60	4,86	2,71
AB1	29,72	6,68	-20,21	15,37	4,96	2,83

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in Ti Protec[®]-Lösung (48h_1Wo)

Die statistische Analyse der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen durch ACh-Stimulation, ergab für die **Inhibitorgruppe 2** nur einen signifikanten Unterschied nach 2 Stunden Lagerungszeit zwischen den Lagerungsgruppen Ti Protec[®] und Taurolidin 0,5% ($p=0,018$) bei einer ACh- Konzentration von $-\log 6,5$. Dieses Ergebnis wies eine große Effektstärke auf.

Für die Lagerungszeiten von 24 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden, 1 Woche und 48 Stunden mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in Ti Protec[®]-Lösung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungsgruppen berechnet werden, in denen die Inhibitorgruppe 2 zum Einsatz kam.

Die durch Fitten ermittelten Maximalwerte für die endothelabhängige Vasodilatation ergaben nach 2 Stunden Lagerungszeit in der Ti Protec[®]-Gruppe $59,46 \pm 3,45\%$, in der Antibiotikagruppe 1 $53,73 \pm 12,48\%$, in der Antibiotikagruppe 2 $46,41 \pm 26,60\%$ und in der Taurolidin 0,5%-Gruppe $27,01 \pm 16,67\%$.

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

Die Daten wiesen bei den Vergleichen zwischen den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die beiden Antibiotikamixturen und die Taurolidin 0,5%-Gruppe eine hohe Streuung auf. Dies war auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen (siehe Tabelle 4.24).

Der EC_{50} -Wert für die halbmaximale Vasodilatation der TiProtec®-Gruppe lag bei einer ACh-Konzentration von $-\log 6,49 \pm 1,42$. Die EC_{50} -Werte der Antibiotikagruppe 1 und 2 sowie der Taurolidin 0,5%-Gruppe lag entweder außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches der verwendeten ACh-Konzentration oder die Standardfehler bzw. die Streuung der Werte war sehr groß. Diese EC_{50} -Werte waren damit nicht valide.

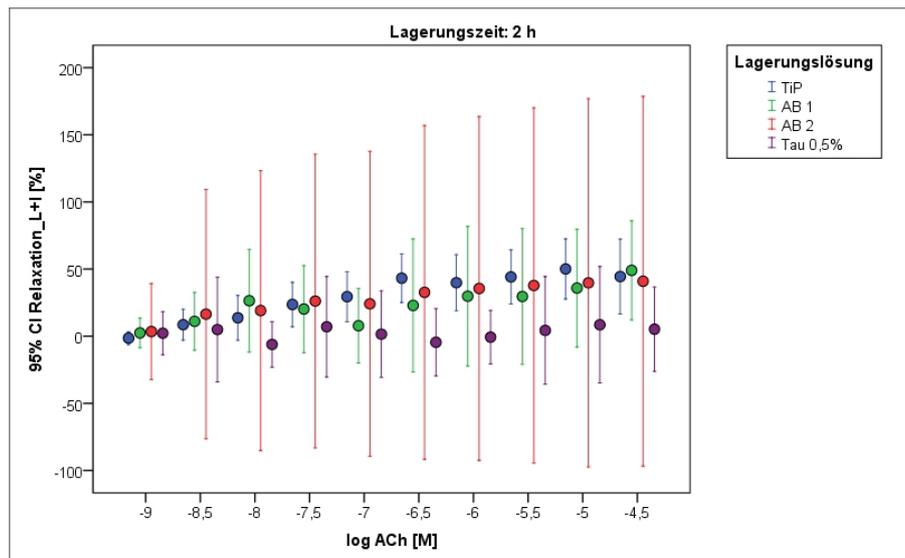


Abb. 4.31: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden

Tab. 4.30: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	59,46	3,45	-6,49	1,42	1,27	0,82
AB1	53,73	12,48	-8,64	10,54	4,72	2,33
AB2	46,41	26,60	-16,28	14,77	5,13	2,68
Tau 0,5%	27,01	16,67	-13,96	14,81	3,83	3,04

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2.

Tab. 4.31: Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorengruppe 2

Lagerungszeit	log ACh [M]	Lagerungslösung	Lagerungslösung	Signifikanzen	Hedge's g*
2h	-6,5	TiP	Tau 0,5%	0,018	2,20

Vergleich der Lagerungslösungen zu einer Lagerungszeit von 2 Stunden bei steigenden ACh-Konzentrationen (log ACh [M]). Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

Für die Lagerungszeit von 24 Stunden wurde die Antibiotikagruppe 2 statt der Antibiotikagruppe 1 untersucht. Die durch Kurvenfitting ermittelten Maximalwerte von TiProtec® lagen bei $46,49 \pm 9,38\%$ und die Antibiotikamixtur 2 bei $43,92 \pm 19,41\%$.

Der durch Kurvenfitting berechnete EC_{50} -Wert für die halbmaximale Vasodilatation lag für die TiProtec®-Gruppe bei einer ACh-Konzentration von $-\log 5,05 \pm 1,04$. Damit wurde im Vergleich zu 2 Stunden Lagerungszeit eine höhere ACh-Konzentration für das Erreichen der halbmaximalen Vasodilatation benötigt. Der EC_{50} -Wert für die Antibiotikamixtur 2 war aufgrund der hohen Streuung der Daten nicht valide (siehe Anhang, Tabelle B.5).

Nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden erreichten die gefitteten Maximalwerte in der TiProtec®-Gruppe $51,89 \pm 12,32\%$ und in der Antibiotikagruppe 1 $46,71 \pm 15,64\%$. Auch hier ist die hohe Streuung der Daten auf eine geringen Anzahl an verfügbaren Arteriensegmenten (AB1= 3) zurückzuführen. Bei beiden Lagerungslösungen ist der EC_{50} -Wert aus bereits bekannten Gründen nicht zu werten.

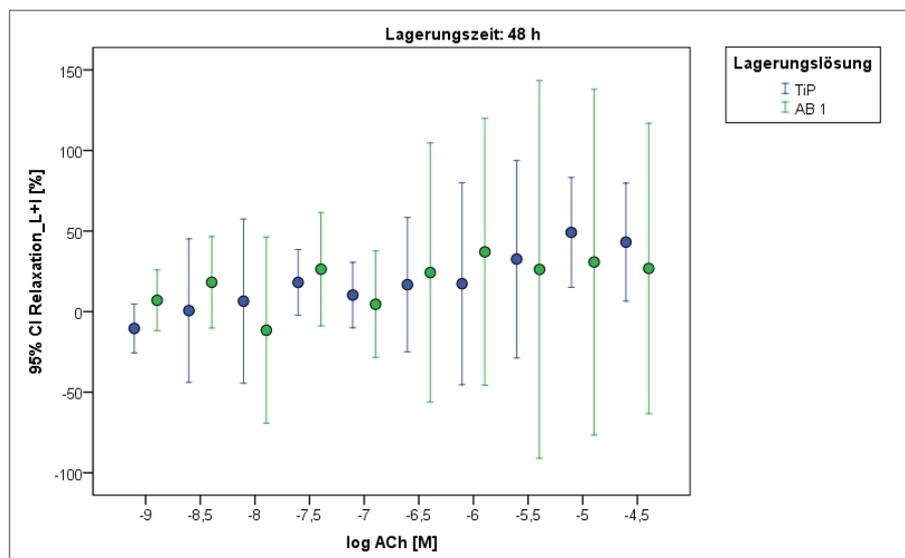


Abb. 4.32: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden

Tab. 4.32: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	51,89	12,32	-6,46	8,03	2,71	2,07
AB1	46,71	15,64	-16,58	14,45	4,92	2,56

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2.

Für eine Lagerungszeit von 96 Stunden lagen die gefitteten Maximalwerte in der TiProtec[®]-Gruppe bei $32,06 \pm 16,97\%$. Für diese Lagerungszeit wurde wieder die Antibiotikagruppe 2 statt der Antibiotikagruppe 1 verwendet. Für diese Lagerungslösung konnte durch Kurvenfitting ein Maximalwert von $9,77 \pm 10,20\%$ berechnet werden. Die Streuung der Daten ist auf den geringen Stichprobenumfang ($n=4$) zurückzuführen. Bei beiden Lagerungslösungen befand sich der EC_{50} -Wert außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches und ist damit nicht valide (siehe Anhang, Tabelle B.6).

Nach 1 Woche erreichten die durch Fitten ermittelten Maximalwerte in der TiProtec[®]-Gruppe $21,99 \pm 14,82\%$. Auch bei dieser Lagerungszeit wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Antibiotikagruppe 2 statt für die Antibiotikagruppe 1 untersucht. Die Lagerungsgruppe erzielte einen gefitteten Maximalwert von $23,54 \pm 10,22\%$. Auch zu dieser Lagerungszeit konnten die ermittelten EC_{50} -Werte nicht in die Bewertung aufgenommen werden (siehe Anhang, Tabelle B.7).

Bei der Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung der Arteriensegmente für weitere fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung lag der durch Fitten ermittelte Maximalwert für die TiProtec[®]-Gruppe bei $40,35 \pm 12,97\%$ und für die Antibiotikagruppe 1 bei $33,27 \pm 15,05\%$. Auch hier waren die ACh-Konzentrationen für die ermittelten EC_{50} -Werte außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches und deshalb nicht valide.

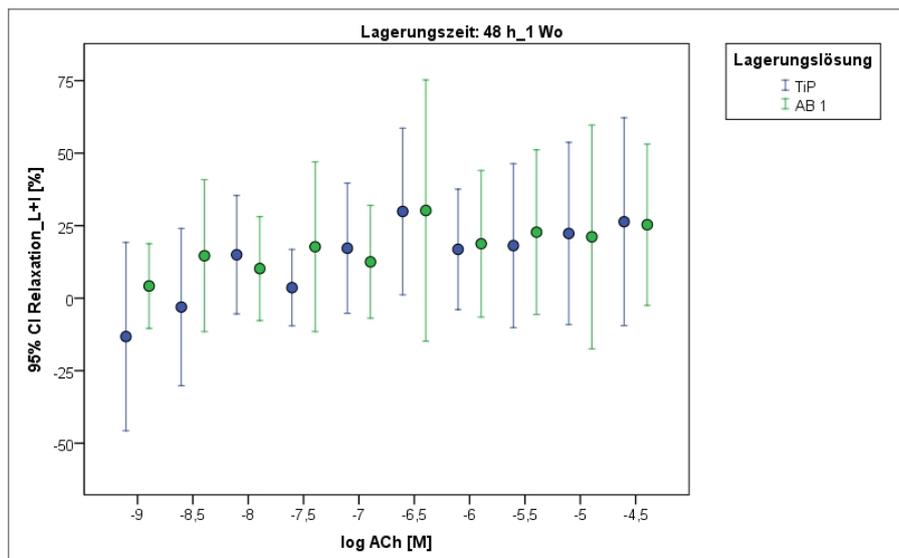


Abb. 4.33: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtect®-Lösung (48h_1Wo)

Tab. 4.33: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	40,35	12,97	-11,82	13,62	4,26	2,64
AB1	33,27	15,05	-12,36	12,96	5,50	2,51

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtect®-Lösung (48h_1Wo)

Bei der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Arteriensegmenten, welche mit der **Inhibitorgruppe 3** versetzt wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der TiProtect®-Lösung und der Antibiotikamixtur 1 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden. Der erste signifikante Unterschied konnte bei einer ACh-Konzentration von $-\log 8,5$ ($p= 0,002$) und der zweite signifikante Unterschied bei einer ACh-Konzentration von $-\log 5$ ($p= 0,004$) ermittelt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese signifikanten Ergebnisse nur eine kleine Effektstärke aufwiesen. Für die anderen Lagerungszeiten konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede berechnet werden.

Es folgt eine Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für diese Lagerungszeiten. Kommen alle vier Inhibitoren zum Einsatz lag nach einer Lagerungszeit von nur 2 Stunden der durch Fitten ermittelten Maximalwert für die Vasodilatation in der TiProtect®-Gruppe bei $17,46 \pm 5,36\%$, in Antibiotikagruppe 1 bei $24,42 \pm 10,86\%$, in der Antibiotikagruppe 2 bei $23,33 \pm 12,69\%$ und in der Taurolidin

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

0,5%-Gruppe bei $10,02 \pm 11,21\%$. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren aufgrund der hohen Streuung der Daten nicht valide.

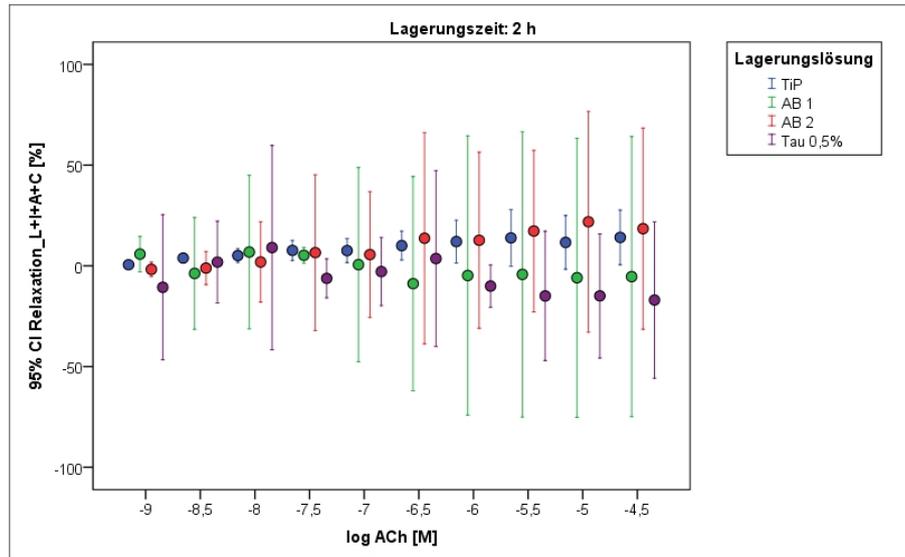


Abb. 4.34: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden

Tab. 4.34: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 2h Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	17,46	5,36	-4,11	4,84	3,11	1,52
AB1	24,42	10,86	-16,35	14,95	4,03	2,99
AB2	23,33	12,69	-6,25	9,17	3,11	2,18
Tau 0,5%	10,02	11,21	-6,98	11,12	1,64	2,36

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 3.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden erreichten die gefitteten Maximalwerte in der TiProtec®-Gruppe $5,50 \pm 1,51\%$. Bei dieser Lagerungszeit wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Antibiotikagruppe 2 statt der Antibiotikagruppe 1 untersucht. Der gefittete Maximalwert lag in dieser antimikrobiellen Lösung bei $8,67 \pm 2,09\%$. Die EC_{50} -Werte befanden sich außerhalb des gemessenen ACh-Konzentrationsbereiches (siehe Anhang, Tabelle B.8).

Nach 48 Stunden Lagerungszeit erreichten die Arteriensegmente einen durch Fitten ermittelten Maximalwert in der TiProtec®-Gruppe von $50,56 \pm 16,13\%$ und für die Antibiotikagruppe 1 von $17,50 \pm 9,04\%$. Die EC_{50} -Werte lagen außerhalb des gemessenen ACh-Konzentrationsbereiches und waren damit nicht valide.

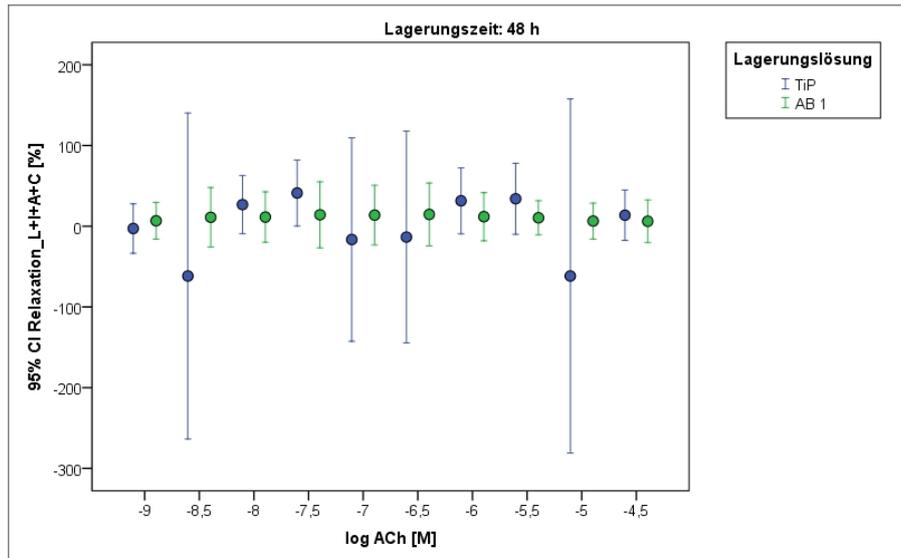


Abb. 4.35: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden

Tab. 4.35: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	50,56	16,13	-21,79	15,34	4,43	2,83
AB1	17,50	9,04	-26,84	13,79	5,12	2,88

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 3.

Tab. 4.36: Signifikante Unterschiede und Effektgrößen der Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 3

Lagerungszeit	log ACh [M]	Lagerungslösung	Lagerungslösung	Signifikanzen	Hedge's g^*
48h	-8,5	TiP	AB1	0,002	0,40
	-5	TiP	AB1	0,004	0,34

Vergleich der Lagerungslösungen zu einer Lagerungszeit von 48 Stunden bei steigenden ACh-Konzentrationen (log ACh [M]). Effektstärke nach Hedge's $g^* = g^* < 0,5 =$ kleiner Effekt; $g^* 0,5-0,8 =$ mittlerer Effekt; $g^* > 0,8 =$ großer Effekt.

Nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden erreichen die durch Fitten ermittelten Maximalwerte für die Vasodilatation in der TiProtec[®]-Gruppe $3,39 \pm 2,21\%$. Für diese Lagerungszeit wurde wieder die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Antibiotikagruppe 2 statt der Antibiotikagruppe 1 untersucht.

4.2 Relaxationsverhalten der Arteriensegmente

Dabei ergaben sich für den gefitteten Maximalwert $4,50 \pm 1,96\%$. Die EC_{50} -Werte konnten nicht gewertet werden (siehe Anhang, Tabelle B.9).

Wurden die Gefäße 1 Woche in TiProtec[®] gelagert und mit den vier Inhibitoren inkubiert, wurden durch Fitten Maximalwerte der Relaxation von $3,42 \pm 4,95\%$ erreicht. Auch für diese Lagerungszeit wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Antibiotikagruppe 2 statt für die Antibiotikagruppe 1 evaluiert. Diese Lagerungsgruppe erreichte einen Maximalwert von $7,13 \pm 2,79\%$. Auch hier waren die ermittelten EC_{50} -Werte nicht valide (siehe Anhang, Tabelle B.10).

Interessant ist, dass nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung der Arteriensegmente für fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung und dem nachfolgenden Zusatz der vier Inhibitoren sich die Arteriensegmente in ihrer Funktionalität bezüglich der maximalen Vasodilatation verbesserten. Die TiProtec[®]-Gruppe erreichte einen gefitteten Maximalwert von $39,36 \pm 11,21\%$ und die Antibiotikagruppe 1 von $29,01 \pm 10,39\%$. Die EC_{50} -Werte lagen außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches.

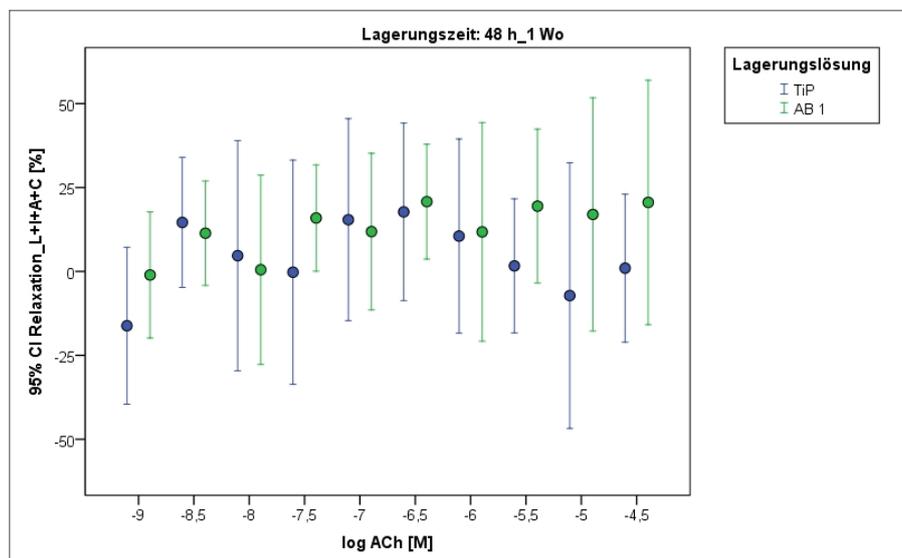


Abb. 4.36: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bei ACh-Stimulation in der Inhibitorengruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®]-Lösung (48h_1Wo)

Tab. 4.37: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 48h_1Wo Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	39,36	11,21	-17,57	15,20	4,79	2,89
AB1	29,01	10,39	-16,56	15,01	5,34	2,67

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung (48h_1Wo)

4.3 Vergleich der Stabilitätsmessungen einzelner Stoffe

Es erfolgten Stabilitätsmessungen der antimikrobiell wirksamen Substanzen in der TiProtec®-Lösung in Anwesenheit und Abwesenheit eines Arteriensegments. Die Lagerungsdauer betrug einheitlich 96 Stunden. Zunächst wurde die Stabilität der Substanzen Fluconazol, Flucloxacillin, Metronidazol und Clindamycin überprüft (siehe Tabelle 4.38).

Tab. 4.38: Ergebnisse der Stabilitätskontrolle der Antibiotika nach 96 Stunden Lagerungszeit

Probe	Arterie ja/nein	Fluconazol 100 $\mu\text{g/ml}$	Staphylex 1000 $\mu\text{g/ml}$	Metronidazol 200 $\mu\text{g/ml}$	Clindamycin 200 $\mu\text{g/ml}$
AB1	nein	99,7	938	199,3	199,8
TiP 62	ja	<1	<2	<1	<1
TiP 63a	ja	<1	<2	<1	<1
TiP 63b	ja	<1	<2	<1	<1
AB1 62	ja	116,0	1108	221,6	209,4
AB1 63a	ja	80,4	1033	169,8	183,7
AB1 63b	ja	105,4	1237	211,3	227,9

AB1= Antibiotikagruppe 1, TiP= TiProtec® ohne Antibiotika,
Zusatz einer Zahl (62–63)= Zusatz eines Gefäßringes, 63a und 63b=
von einem Patienten konnten zwei Gefäßringe verwendet werden.

Die Antibiotikagruppe 1 (AB1) wurde als Kontrollgruppe ohne Arteriensegment mitgeführt. Die Analyse ergab, dass die Substanzen mittels HPLC nachweisbar waren und nach 96 Stunden Lagerung in TiProtec®-Lösung stabil blieben. Bei den anderen Versuchen wurde zusätzlich ein Arteriensegment in der Lagerungslösung mit gelagert. In einem Fall standen von einem Patienten (Nummer 63) zwei Arteriensegmente zur Verfügung. Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier die antimikrobiellen Substanzen nach

96 Stunden Lagerung nachweisbar blieben. Lediglich in der Gruppe AB1 63a war die Konzentration von Fluconazol geringfügig (um 19,6%) niedriger als in den Vergleichsgruppen.

Das Antibiotikum Gentamicin und das Antimykotikum Itraconazol waren mit dieser HPLC-Methode nicht nachweisbar. Wie im Abschnitt 3.4 beschrieben, wurden die Messungen mit einer isokratischer HPLC mit Fluoreszenz-Detektion (Itraconazol) bzw. wurde mittels photometrischer/ Immunturbidimetrische Messung (KIMS) (Gentamicin) gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.39 zusammengefasst.

Tab. 4.39: Stabilität von Itraconazol und Gentamicin nach 96 Stunden Lagerungszeit

Probe	Arterie ja/nein	Zeit [h]	Itraconazol [µg/l]	Gentamicin [mg/l]
AB1	nein	0	15622	22,62
TiP	nein	0	<30	<0,8
AB1 75	ja	96	6487	16,98
AB1 76	ja	96	13291	13,32
TiP 75	ja	96	287	<0,8
TiP 76	ja	96	<30	<0,8

AB1= Antibiotikagruppe 1, TiP= TiProtec® ohne Antibiotika, 75 und 76= Zusatz eines Gefäßringes

Bei Abwesenheit von Itraconazol bzw. Gentamicin waren Hintergrundsignale entweder schwach oder fehlten. Die Zugaben von Itraconazol und Gentamicin in TiProtec® ergaben deutliche Signale in An- und Abwesenheit eines Gefäßsegmentes. Auch nach 96 Stunden Lagerungsdauer waren die Antibiotika in Anwesenheit eines Gefäßsegmentes gut nachweisbar. Die Konzentration von Itraconazol war im Vergleich zur Ausgangskonzentration in der Probenlösung AB1 75 um ca. 58,48% und in der Probenlösung AB1 76 um ca. 14,93% reduziert. Bei Gentamicin ergab sich im Vergleich zur Ausgangskonzentration nach 96 Stunden Lagerung ein Verlust der Konzentration in der Probenlösung AB1 75 um 24,93% und in der Probenlösung AB1 76 um 41,12%.

4.3.1 Stabilitätsmessungen von Taurolidin

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben wurden die Stabilitätsmessungen von Taurolidin mittels colorimetrischer Methode mit NASH-Reagenz durchgeführt. Die statistische Analyse ergab einen hoch signifikanten Unterschied ($p=0,000$) zwischen einer Lagerungszeit von 2 Stunden ($n=8$) und 48 Stunden ($n=13$). Taurolidin war in TiProtec® gelöst und es wurde ein Arteriensegment mit gelagert. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Taurolidin unter diesen Bedingungen über 48 Stunden stabil blieb.

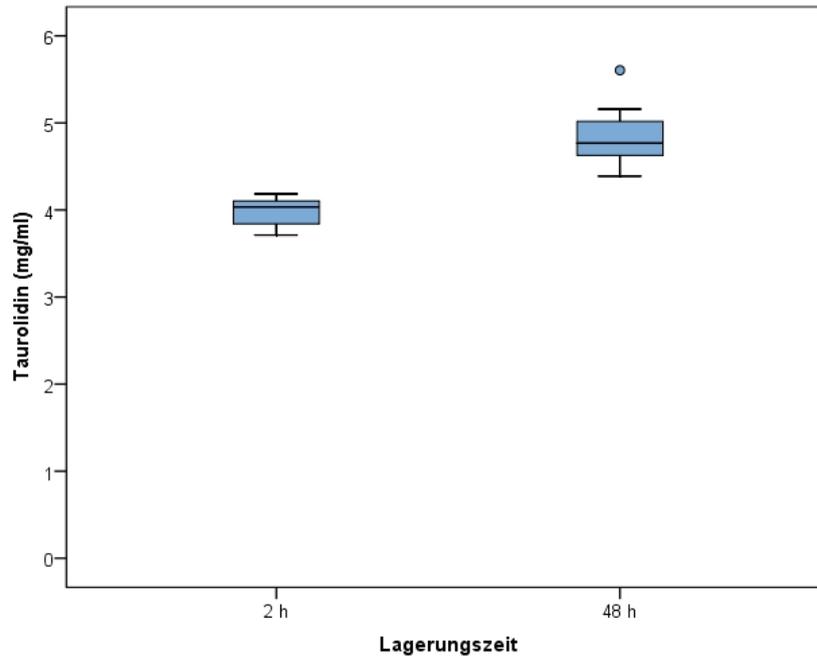


Abb. 4.37: Stabilitätsmessung von Taurolidin in TiProtec[®]-Lösung kombiniert mit einem Arteriensegment

4.4 Ergebnisse der LDH-Messungen

Zwischen den Lagerungsgruppen lagen generell keine signifikanten Unterschiede vor. Die Analyse der Laktatdehydrogenase-Messungen ergaben aber einige signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungsgruppe (siehe Tabelle 4.41 und Abbildung 4.38). In der TiProtec[®]-Lösung unterschied sich signifikant der LDH-Anstieg zwischen 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit im Vergleich zu 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] ($p=0,012$). In der Antibiotikagruppe 1 gab es keine signifikanten Unterschiede. In der Taurolidin 0,5%-Gruppe gab es wie in der TiProtec[®]-Gruppe zwischen 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit im Vergleich zu 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] ($p=0,024$) einen signifikanten Unterschied. Zwischen den Lagerungsgruppen gab es keine Signifikanzen.

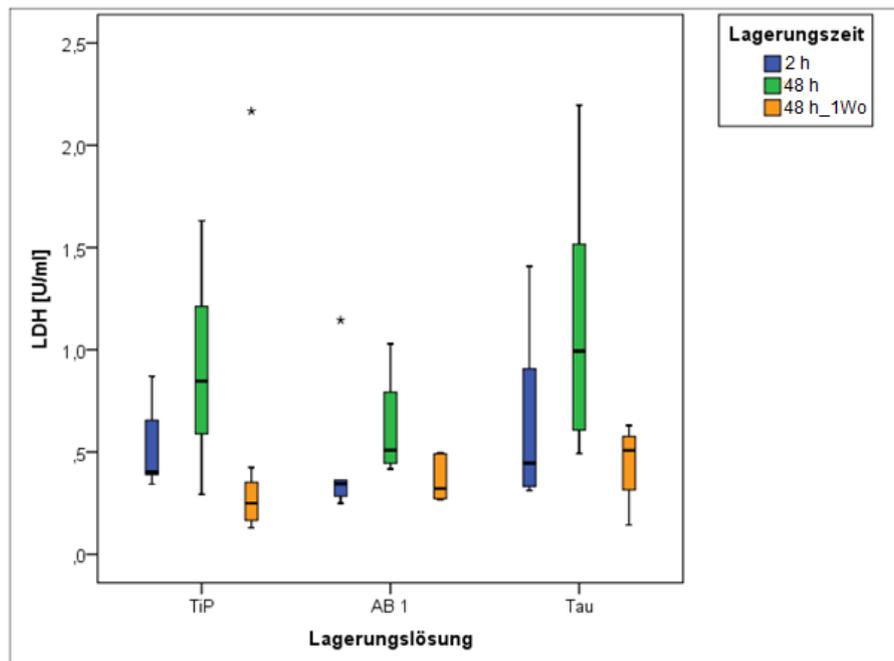


Abb. 4.38: Laktatdehydrogenase-Messungen in ausgewählten Versuchsgruppen (*Ausreißer), 48h_1Wo = Lagerung der Gefäßsegmente 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung

Tab. 4.40: Anzahl der verwendeten Proben bei den LDH-Messungen

Lagerungszeit	TiP	AB1	Tau 0,5%
2h	7	6	8
48h	14	9	13
48h_1Wo	8	6	7

48h_1Wo = Lagerung der Gefäßsegmente
48 Stunden in einer Dekontaminationslösung
mit anschließender Umlagerung für weitere
fünf Tage in TiProtec®-Lösung

Tab. 4.41: Signifikante Unterschiede und Effektgrößen bei den LDH-Messungen

Lagerungslösung	Lagerungszeit	Lagerungszeit	Signifikanz	Hedge's g*
TiP	48h	48h_1Wo	0,012	0,77
Tau 0,5%	48h	48h_1Wo	0,024	0,48

Effektstärke nach Hedge's g* = g* < 0,5 = kleiner Effekt;
g* 0,5–0,8 = mittlerer Effekt; g* > 0,8 = großer Effekt.
48h_1Wo = Lagerung der Gefäßsegmente 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec®-Lösung

4.5 Vergleich der Patientendaten

Es wurden 471 A. mammaria interna-Segmente von 95 Patienten untersucht. Die experimentellen Untersuchungen an den Gefäßen wurden ohne Kenntnis der Vorerkrankungen oder der täglichen Medikamenteneinnahme im Vorfeld der Operation durchgeführt. Nach den Experimenten wurde Einsicht in die Patientenakten genommen. In diese Studie wurden Gefäße von 20 weiblichen Patienten und 75 männliche Patienten untersucht. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen war $73,05 \pm 1,0$ Jahre und das Alter bei den Patienten lag bei $69,05 \pm 1,1$ Jahren. Der BMI (kg/m^2) war im Durchschnitt bei den weiblichen Patienten $28,2 \pm 0,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ und bei den männlichen Patienten $27,9 \pm 0,5 \text{ kg}/\text{m}^2$. In der Tabelle 4.42 ist im Detail das kardiovaskuläre Risikoprofil und die Dauermedikation der in die Studie aufgenommenen Patienten aufgeführt.

Tab. 4.42: Übersicht über die Verteilung kardiovaskulären Risikoerkrankungen und die präoperative Medikation in der Patientengruppe (n= 95)

Risikofaktoren	Weibliche Patienten		Männliche Patienten	
	n	%	n	%
Hypertonie	20	100	73	97,3
Hyperlipidämie	15	75	50	66,7
Diabetes mellitus	9	45	28	37,3
Raucher	1	5	9	12
Ex-Raucher	3	15	18	24
Medikation	n	%	n	%
ACE-Hemmer	8	40	39	52
AT1-Blocker	10	50	22	29,3
β -Blocker	15	75	56	74,7
Diuretika	12	60	32	42,7
Ca-Antagonist	8	40	24	32
Nitrate	4	20	11	14,7
Andere Hypertonika	6	30	7	9,3
Statine + Lipidsenker	17	85	61	81,3
ASS	15	75	63	84
Clopidogrel	4	20	6	8

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war Dekontaminationslösungen zu testen, welche sowohl das typische Keimspektrum von Gefäßtransplantaten abdecken, als auch die Funktionalität der Gefäße erhalten und damit die Qualität dieser Transplantate verbessern. Aufbauend auf den guten Ergebnissen mit der Gefäßprotektionslösung TiProtec[®] bei der Lagerung von humanen A. mammaria interna (Garbe, 2011), wurde diese Gefäßprotektionslösung TiProtec[®] auch für diese Arbeit ausgewählt. Auch andere Arbeiten bestätigen die gute Funktionalität von Gefäßen bei Verwendung von TiProtec[®] wie z.B. bei Arterien von Ratten in vitro (Zatschler et al., 2009; Ebner et al., 2011; Veres et al., 2016) und in vivo (Veres et al., 2016), Schweineaorta in vitro (Wille et al., 2008) oder bei humanen V. saphena magna bei Kurz- (Wilbring et al., 2011) oder Langzeitlagerung (Wilbring et al., 2013).

Die humane A. mammaria interna gilt als Goldstandard für die Bypasschirurgie am Herzen. Die Arterien stammen von multimorbiden Patienten mit meist einer großen Anzahl an präoperativer Medikation. Auch bei der Prozessierung der Gefäße auf den Gewebebanken werden häufig solche Spendergefäße in dieser Qualität verwendet. Durch die Einführung des Gewebegesetzes unterliegt die Verarbeitung und Lagerung der Gefäßtransplantate dem Arzneimittelgesetz (Bundestag, 2007, 2012). Dadurch unterliegen die Prozessierung und die Dekontamination der Gefäße strengen Regelungen, um die Sicherheit des Patienten zu gewährleisten. Jede Gewebebank muss die Daten zu ihrem verwendeten Dekontaminationscocktail verschiedenen Behörden vorlegen (siehe Abschnitt 2.2.5). Es obliegt jedoch der Gewebebank, welche antimikrobiell wirksamen Substanzen verwendet werden. Deswegen gibt es hier keine einheitlichen Regelungen. Oft werden antimikrobiell wirksame Substanzen verwendet, welche endothelschädigend sind, wie beispielsweise das Amphotericin B (Ebner et al., 2011).

Im Hinblick auf die Zunahme der Resistenzlage gegenüber Antibiotika wurde in dieser Arbeit auch das Antiseptikum Taurolidin in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Das günstige Nebenwirkungsprofil und die standardmäßige Verwendung als Katheterspüllösung oder als Spüllösung des Bauchraumes bei Peritonitis machten dieses Antiseptikum für die Dekontamination von Gefäßtransplantaten interessant. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass Taurolidin in einer antibakteriell wirksamen Konzentration endothelschädigend ist und deshalb nur bedingt verwendet werden kann. Dagegen zeigen die Arteriensegmente bei der Lagerung in den beiden Antibiotikallösungen einen guten Erhalt der Gefäßfunktion, worauf im Verlauf der Diskussion eingegangen wird.

5.1 Die Bedeutung einer guten Gefäßfunktion

Das Endothel in Gefäßen hat wichtige strukturelle und funktionelle Barrierefunktionen. Werden Endothelzellen durch verschiedene Faktoren, wie mechanische Schädigung bei der Entnahme, Ischämie, Hypothermie, Reperfusion oder toxische Schäden durch eine antimikrobielle Lagerungslösung geschädigt, so ist die Funktionalität des Gefäßes stark eingeschränkt (Zilla et al., 1993). Durch die Schädigung wird die thrombogene subzelluläre Matrix exponiert, wodurch es zur Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion kommt. Die Thrombose ist gerade in ersten Wochen nach der Transplantation einer der Hauptgründe für einen akuten Gefäßverschluss (Zilla et al., 1993). Durch die Thrombozyten werden weiterhin Wachstumsfaktoren freigesetzt, wodurch es zur Intimahyperplasie und damit zur Transplantatstenose kommt (Usuki et al., 1992). Des Weiteren setzen geschädigten Endothelzellen weniger NO frei. Dadurch wird eine ganze Vielfalt an Schutzmechanismen des Endothels reduziert. So fehlt die hemmende Wirkung von NO auf die Plättchenaggregation oder die Proliferation der glatten Muskulatur. Außerdem kann es bei fehlendem NO zu Episoden von Gefäßspasmen kommen oder die Entstehung von Artherosklerose wird gefördert (Zilla et al., 1993; Vanhoutte et al., 2015; Vanhoutte, 2016). Andere Studien zeigen, dass durch ein geschädigtes Endothel und eine damit verbundene Einwanderung von Entzündungszellen in die Gefäßwand Artheroskleroseplaques entstehen, welche wiederum zu strukturellen Stenosen oder lokalen Gefäßspasmen beitragen können (MacAlpin, 1980; Suzuki et al., 1999).

Geschädigte Gefäße neigen eher zum Transplantatversagen, da es z.B. zu Blutungen oder Nahtinsuffizienz kommen kann. Deshalb ist die Protektion der Gefäßfunktion, insbesondere der Endothelfunktion, entscheidend für die Qualität und den Erfolg der Gefäßtransplantation.

5.1.1 Kontraktionseigenschaften der Arteriensegmente

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zwischen den Lagerungsgruppen der TiProtec[®]-Gruppe, der Antibiotikagruppe 1 und 2, sowie der Taurolidin 0,002%-Gruppe keine signifikanten Unterschiede in der rezeptorunabhängigen Tonusentwicklung unter KPSS gab (siehe Abschnitt 4.1.1). Ein ähnliches Ergebnis wurde während der rezeptorabhängigen Kontraktionsantwort unter Noradrenalin erhalten (siehe Abschnitt 4.1.2).

Es wurden jedoch insgesamt höhere Werte bei der kontraktiven Wandspannungsentwicklung unter Noradrenalin im Vergleich zu KPSS erreicht. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungsgruppe detektiert werden. Sowohl für die maximal erreichten Werte der Gefäßkontraktion unter KPSS als auch unter Noradrenalin bedeutet dies für die einzelnen Lagerungsgruppen:

Eine gleichbleibend gute Tonusentwicklung während der unterschiedlichen Lagerungszeiten konnte durch die Antibiotikagruppe 2 erzielt werden (Abbildungen 4.1–4.9). Hier gab es keine signifikanten Unterschiede. In der TiProtec[®]-Gruppe gab es jeweils nur einen signifikanten Unterschied zwischen den Lagerungszeiten, welcher eine Effektstärke von kleiner bis mittlerer Relevanz nach Hedge's g^* erreichte. Daher erscheint dieser Unterschied eher nachrangig (Abbildungen 4.1 und 4.2, Tabellen 4.2 und 4.3). Diese homogenen Ergebnisse für die maximal erreichte Vasokontraktion decken sich gut mit den Ergebnissen

aus der Arbeit von Garbe et al. (Garbe, 2011). In der Taurolidin 0,002%-Gruppe ergaben sich jeweils zwei signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungszeiten. Nach Hedge's g^* ergab sich eine große Effektstärke für diese Ergebnisse. Damit war eine signifikante Tonusminderung der Gefäßsegmente ab einer Lagerungszeit von 48 Stunden im Vergleich zu dem maximal erzielten Werten nach zwei Stunden zu detektieren. Am deutlichsten war die Reduzierung der maximalen rezeptorunabhängigen und rezeptorabhängigen Wandspannungsentwicklung zwischen den Lagerungszeiten in der Antibiotikagruppe 1. Auch hier konnte eine große Effektstärke berechnet werden (Abbildungen 4.1 und 4.2, Tabellen 4.2 und 4.3). Trotz dieser signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungszeiten innerhalb einer Lagerungsgruppe, sei noch einmal darauf hingewiesen, dass es zwischen den vier aufgeführten Lagerungsgruppen weder bei der rezeptorunabhängigen- noch bei der rezeptorabhängigen Kontraktionsantwort signifikante Unterschiede bestanden. Dies legt die Vorstellung nahe, dass zeitabhängige Einschränkungen der Tonisierung bestehen, die unabhängig von der Zusammensetzung der Lagerungslösung sind.

Die Funktionsmessungen ergaben bei Taurolidin 0,5% zu wenige funktionstüchtige Gefäße, sodass die Streuung der Daten zu groß waren und diese nicht statistisch ausgewertet werden konnten. Grundsätzlich weist dieser Umstand aber darauf hin, dass Taurolidin in der hohen Konzentration nicht unproblematisch für die Gefäßfunktion ist und daher den geprüften Antibiotikallösungen wahrscheinlich unterlegen ist. In der Fachinformation wird für Taurolidin eine geringe Toxizität angegeben. Die intravenöse LD50 bei Mäusen liegt bei > 4000 mg/kg Körpergewicht und bei Kaninchen > 3600 mg/kg Körpergewicht. Die geringe Toxizität wird durch den Abbau der Wirksubstanz zum endogenen Taurin sowie dem Mechanismus der Übertragung der Methylol-Gruppen erklärt (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a). Dennoch wird bei intravenöser Infusion beim Menschen über örtliches Brennen bis hin zu Schmerzen berichtet (Linder et al., 1981; Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a). In Experimenten von Möhler et al. reduzierte Taurolidin oder Taurultam die Endothelzellproliferation, die Endothelzelladhäsion durch Laminin, sowie die VEGF-induzierte Angiogenese (Möhler, 2008). Diese Wirkungen sind mit einer Endothelschädigung verbunden, die zum Beispiel auch zu einer Abnahme der endothelabhängigen Gefäßrelaxation führt. Es wird vermutet, dass es unter Taurolidin durch den Verlust des Zell-Matrix Kontaktes zur Anoikis (eine Form der Apoptose) kommt (Möhler, 2008). Das Gefäßendothel unterliegt einem konstanten Wandel durch Reparaturmechanismen als Antwort auf mechanische oder chemische Schädigungen (Yoo & Kim, 2009). Diese Mechanismen scheinen durch Taurolidin beeinflusst zu werden und haben wahrscheinlich auch einen Einfluss auf die Tonusregulation der Gefäße.

Noradrenalin führt an den Gefäßpräparaten in der Regel zu einer anhaltenden Tonisierung. An funktionell guten Präparaten hält diese Tonisierung mindestens 10 Minuten konstant an (Plateau). Als ein Kriterium für unveränderte Gefäßstabilität wurde diese nach Applikation von Noradrenalin über 10 Minuten bewertet.

Nach 2 Stunden Lagerungszeit zeigten sich bei den Stabilitätsmessungen während der 10-minütigen Stimulationsphase unter Noradrenalin keine signifikanten Unterschiede. Die Wandspannungsentwicklung blieb während dieser Zeit unabhängig von der Lagerungslösung stabil (Abbildungen 4.3–4.6).

Nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden neigten die Arteriensegmente unter Noradrenalinstimulation stärker zu kontrahieren. Zeitparallel stieg aber die Streuung der Daten an (siehe Anhang, Abbildung B.1).

Nach 48 Stunden Lagerungszeit zeigt sich die erste Tendenz zu einer Störung der anhaltenden Kontraktion nach Noradrenalin bei der Antibiotikagruppe 1 (Abbildung 4.4). Signifikante Unterschiede traten schon nach fünf Minuten Registrierung des Kontraktionsplateaus gegenüber der TiProtec[®]-Lösung und ab der achten Minute auch gegenüber der Taurolidin 0,002%-Gruppe auf. Nach 96 Stunden Lagerungszeit entstanden zusätzliche Signifikanzen zwischen den Antibiotikagruppen 1 und 2 ab der vierten Minute (Tabelle 4.4). Interessant ist, dass nach 48-stündiger Lagerung in einer der Lagerungslösungen mit anschließender Umlagerung in frische TiProtec[®]-Lösung für weitere fünf Tage die Tonusentwicklung nach Stimulation mit Noradrenalin zunehmend streut. Es wechselten sich Phasen der Kontraktion mit Phasen der Relaxation ab (Abbildung 4.6). Trotzdem gab es auch hier signifikante Unterschiede ab der achten Minute zwischen der Antibiotikagruppe 1 und der TiProtec[®]-Gruppe. Alle signifikanten Unterschiede während der Stimulationsphase unter Noradrenalin hatten eine große Effektstärke nach dem Berechnungsmodell von Hedge's g^* (Tabelle 4.4).

Evaluation der Kontraktions-Eigenschaften der einzelnen Antibiotika durch KPSS- und Noradrenalin-Stimulation nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

Um mögliche Unterschiede zwischen den Antibiotikagruppen besser interpretieren zu können, wurden Gefäßsegmente auch mit den einzelnen antimikrobiellen Substanzen in TiProtec[®]-Lösung gelagert und anschließend den Funktionsmessungen unterzogen. Hierbei wurde nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden weder bei der Stimulation mit KPSS, noch mit Noradrenalin ein signifikanter Unterschied nach der Lagerung unter Zusatz der verschiedenen antimikrobiellen Substanzen beobachtet. Lediglich die Werte von Fluconazol in der TiProtec[®]-Lösung streuen bei der Wandspannungsentwicklung unter KPSS mehr als bei der Inkubation mit den übrigen Dekontaminationsstoffen (Abbildungen 4.7 und 4.8).

Eine Studie von Ebner et al. zeigt ähnliche Ergebnisse in der rezeptorunabhängigen- und rezeptorabhängigen Wandspannungsentwicklung in der Aorta (elastischer Typ) und der A. saphena (muskulärer Typ) von Ratten (Ebner et al., 2011). Dabei wurde die maximale kontraktile Antwort der Arterien nach einer Lagerung von vier Tagen weder durch Gentamicin noch durch Metronidazol vermindert. Interessant ist, dass Flucloxacillin in der Aorta der Ratte die Wandspannungsentwicklung unter KPSS und Noradrenalin signifikant reduzierte. Dagegen zeigte das Antibiotikum keine Reduzierung bei den kontraktilen Antworten an der A. saphena (Ebner et al., 2011).

Im Gegensatz zur Maximalkonstriktion unter Noradrenalin gibt es jedoch signifikante Unterschiede bei der Kinetik der Konstriktion während der Stimulationsphase. Schon ab der vierten Registrierminute unterschied sich Flucloxacillin von der Substanzgruppe Clindamycin und Itraconazol. Ab der fünften Minute gab es auch signifikante Unterschiede zu Gentamicin und ab der neunten Minute auch zu Metronidazol und Fluconazol (Tabelle 4.6). Damit verhindert Flucloxacillin die Entwicklung einer stabilen Plateauphase unter Noradrenalin. Im Gegensatz zu Flucloxacillin zeigte sich bei der Gabe von Itraconazol und Gentamicin eine zunehmende Kontraktion während der Plateauphase. Der Unterschied war signifikant in der neunten Minute nach Beginn der Noradrenalinstimulation (Tabelle 4.6).

5.1.2 Relaxationseigenschaften der Arteriensegmente

Evaluation der endothelabhängigen Relaxationseigenschaften bei ACh-Stimulation

Generell wird eine endotheliale Dysfunktion durch die Verminderung der endothelabhängigen Vasodilatation und durch die reduzierte eNOS-abgeleitete NO-Bioaktivität charakterisiert (Yoo & Kim, 2009; Vanhoutte et al., 2015).

Bei der endothelabhängigen Vasodilatation unter ACh konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Lagerungslösungen für die maximal erreichte Vasodilatation (Maximalwerte durch Mittelung der Messdaten) berechnet werden (Abbildungen 4.11 und 4.12). Wie bei der kontraktiven Wandspannungsentwicklung gab es allerdings signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungszeiten bei Verwendung der gleichen Lagerungslösung. Für eine zuverlässige Bewertung der signifikanten Unterschiede wurde zusätzlich die Effektstärke nach Hedge's g^* berechnet. Für die einzelnen Lagerungsgruppen kann folgendes im Ausgesagt werden:

Bei der TiProtec[®]-Gruppe ohne Antibiotikazusatz reduzierte sich die maximal erreichte Vasodilatation bei ACh-Zugabe über die Zeit signifikant (Tabelle 4.8). In der Arbeit von Garbe et al. stieg hingegen der Maximalwert zwischen einer Lagerungszeit von 2 Stunden ($77 \pm 12\%$) und 96 Stunden ($80 \pm 12\%$) an (Garbe, 2011). Auch in der Antibiotikagruppe 1 sank in der vorliegenden Studie die maximal erreichte endothelabhängige Vasodilatation ab. Es gab signifikante Unterschiede zwischen zwei Stunden Lagerung und Lagerung für 96 Stunden, 1 Woche und 48 Stunden in TiProtec[®] mit Umlagerung für weitere fünf Tage in frische TiProtec[®]-Lösung (Tabelle 4.8).

In der Antibiotikagruppe 2 gab es nur einen signifikanten Unterschied bei der maximal erreichten Vasodilatation zwischen zwei und 96 Stunden. Dagegen blieben die Maximalwerte der Messdaten unter ACh in der Taurolidin 0,002%-Gruppe zwischen den Lagerungszeiten stabil (Tabelle 4.8).

Die Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung in dieser Arbeit spiegelt teilweise die biphasischen Eigenschaften von ACh wieder. In niedrigen Konzentrationen neigen die Gefäße mehr zur Vasodilatation und bei hohen Konzentrationen mehr zur Kontraktion (Miwa et al., 2005). Bei der stufenweisen Erhöhung der ACh-Konzentration konnten nach einer Lagerungszeit von 2 Stunden signifikante Unterschiede ab einer ACh-Konzentration von $-\log 6$ zwischen Taurolidin 0,5% und den anderen Lagerungsgruppen der Antibiotikamixtur 1 und 2 sowie der TiProtec[®]-Gruppe berechnet werden (Tabelle 4.11). Der durch Kurvenfitting ermittelte maximale Relaxationswert in der Lagerungsgruppe von Taurolidin 0,5% über 2 Stunden lag bei $42,24 \pm 11,81\%$. Der hierzu gehörende EC_{50} -Wert lag außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs. Dies ist am ehesten der hohen Variabilität der Messergebnisse geschuldet. Weiterführende Experimente wären indiziert (Tabelle 4.10).

Für das Erreichen der halbmaximalen Vasodilatation nach 2 Stunden Lagerungszeit wurden folgende ACh-Konzentrationen ermittelt: in der TiProtec[®]-Gruppe $-\log 6,06 \pm 1,27$, in der Antibiotikamixtur 1 $-\log 6,05 \pm 0,70$, in der Antibiotikamixtur 2 $-\log 5,88 \pm 1,99$ und in der Taurolidin 0,002%-Gruppe $-\log 5,09 \pm 1,96$ (Tabelle 4.27).

Bereits nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden wurde eine deutlich höhere ACh-Konzentration für

das Erreichen der halbmaximalen Vasodilatation in den Lagerungsgruppen TiProtec[®], Antibiotikamixtur 1 und Taurolidin 0,002% benötigt. Dennoch lagen bei diesen drei Lagerungslösungen die berechneten EC₅₀-Werte außerhalb des eingesetzten Konzentrationsbereiches. Sie erscheinen daher aufgrund der Streuungen der Daten nicht valide (Tabelle 4.12). Eine Ausnahme bildet hier die Antibiotikamixtur 2. Bei dieser Lagerungslösung wurden erst nach 96 Stunden Lagerungszeit eine höhere Konzentration an ACh von $-\log 3,57 \pm 1,61$ benötigt, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen (siehe Anhang, Tabelle B.2). Es sei dennoch darauf hingewiesen, dass sich der berechnete EC₅₀-Wert außerhalb des eingesetzten Konzentrationsbereiches befand und damit auch in diesem Fall nicht zuverlässig bewertbar war.

In der Arbeit von Garbe et al. (Garbe, 2011) wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine unveränderte Konzentrationswirkungskurve für ACh nach 96 Stunden Lagerung in Tiprotec[®] beschrieben. Eine signifikante Verminderung der ACh-induzierten Vasodilatation zeigte sich in der Arbeit erst nach 11 Tagen (Garbe, 2011). Die teils widersprüchlichen Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die abweichenden Ergebnisse der Konzentrations-Wirkungskurven zwischen den einzelnen Studien doch erheblich zufallsbedingt sind und daher davon ausgegangen werden kann, dass es eher um ein falsch positives Ergebnis handelt. In diese Richtung weisen auch die Analysen der EC₅₀-Berechnung durch Kurvenfitten. Das dem zugrunde liegende Modell (Formel 6 im Material- und Methodenteil) ergab für den erhobenen Datensatz keine zuverlässige Schätzung des EC₅₀-Wertes im untersuchten Konzentrationsbereich.

Aufgrund dieser heterogenen Ergebnisse wären weitere Versuche mit höherem Stichprobenumfang indiziert, um eine höhere Aussagesicherheit zu erreichen. Da die endothelvermittelte Relaxation in der vorliegenden Arbeit nach 96 Stunden progredient abnahm, wurden die Gefäße in einer zusätzlichen Versuchsgruppe für 48 Stunden in der jeweiligen Dekontaminationslösung gelagert und anschließend für weitere fünf Tage in TiProtec[®] ohne antimikrobiellen Zusatz gelagert. Dieses Vorgehen entspricht am ehesten der zur Dekontamination genutzten Prozedur in einer Gefäßbank. Allerdings zeigten auch hier die Ergebnisse, dass die EC₅₀-Werte außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches lagen und die Streuung der Daten hoch war, sodass die Ergebnisse nicht valide waren (Tabelle 4.14). Mögliche Abweichungen der EC₅₀-Werte infolge der Dekontamination und verlängerten Lagerungsdauer konnten daher weder statistisch belegt noch ausgeschlossen werden.

Evaluation der endothelunabhängigen Relaxationseigenschaften bei SNP-Stimulation

SNP bewirkt eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), welches direkt auf die glatte Muskulatur der Media wirkt und damit eine endothelunabhängige Vasodilatation auslöst (Wilbring et al., 2011; Veres et al., 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nur bei der endothelunabhängigen Relaxation der Gefäßsegmente signifikante Unterschiede zwischen den Maximalwerten der unterschiedlichen Lagerungsgruppen gab. Bei diesen Maximalwerten handelt es sich um Mittelwertbildungen aus den Messdaten. Signifikante Unterschiede in der maximal erreichten Vasodilatation konnten bei einer Lagerungszeit von 48 Stunden in einer antimikrobiell wirksamen Lösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] zwischen den Antibiotikamixturen 1 und 2 berechnet werden ($p=0,040$). Dieses signifikante Ergebnis wies nur eine mittlere Effektstärke nach Hedge's g^* auf (0,76). Zu dieser Lagerungszeit wies der Unterschied zwischen den signifikant verschiedenen Maximalwerten zwischen

der Antibiotikamixtur 1 und der Taurolidin 0,002%-Gruppe eine hohe Effekstärke auf ($p=0,012$) (Tabelle 4.9). Die Antibiotikagruppe 1 erreicht damit im Vergleich zur Antibiotikagruppe 2 und der Taurolidin 0,002%-Gruppe signifikant höhere Maximalwerte für die endothelunabhängige Vasodilatation während einer Lagerungszeit von 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] (Abbildung 4.20).

Diese Ergebnisse werden auch durch die Vergleiche der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen gestützt. Ab einer SNP-Konzentration von $-\log 7,5$ bis $-\log 5$ unterschied sich die Antibiotikagruppe 1 von der Antibiotikagruppe 2 signifikant. Jedoch gab es zwischen der Antibiotikamixtur 1 und der Taurolidin 0,002%-Gruppe nur einen signifikanten Unterschied bei einer Konzentration von $-\log 4$ ($p=0,048$). Auch dieser signifikante Unterschied hatte eine große Relevanz nach der Effekstärkenberechnung von Hedge's g^* (Tabelle 4.15).

Insgesamt wiesen die durch Kurvenfitting ermittelten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für SNP-Stimulation eine geringere Streuung im Vergleich zur ACh-induzierten Vasodilatation auf. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für alle Lagerungsgruppen durch Kurvenfitting ähnliche Maximalwerte für die endothelunabhängigen Relaxationsantwort über die Langzeitlagerung bis zu einer Woche ermittelt wurden. Die EC_{50} -Werte zeigten, dass nur eine geringe Konzentration an SNP nötig war, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen. Interessant ist, dass sich der EC_{50} -Wert bei den höheren Lagerungszeiten sogar reduzierte. Damit wurden geringere Konzentrationen an SNP benötigt, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen (Abbildungen 4.17–4.20; siehe Anhang, Abbildungen B.5–6; Tabellen 4.16–4.19; siehe Anhang, Tabellen B.3–4). Dies könnte auf eine Sensitivierung für die SNP-abhängige Relaxation hinweisen.

In der TiProtec[®]-Gruppe waren die Unterschiede zwischen den Maximalwerten der Relaxation während des gesamten Lagerungsverlaufes nicht signifikant (Abbildung 4.12). Dieses Ergebnis deckt sich mit demjenigen aus der Arbeit von Garbe et al. In dieser Arbeit betrug die maximale endothelunabhängige Vasodilationsantwort sogar nach knapp drei Wochen noch $76 \pm 21\%$ und war damit nur unwesentlich niedriger als zum Zeitpunkt 4 Stunden (Garbe, 2011).

Evaluation der Relaxations-Eigenschaften der einzelnen Antibiotika durch ACh- und SNP-Stimulation nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

Die Arteriensegmente wurden auf ihre Relaxations-Eigenschaften nach einer Lagerung in den einzelnen Antibiotika in TiProtec[®]-Lösung nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden untersucht.

Die Maximalwerte der Messdaten unterschieden sich nicht signifikant weder für die endothelabhängige noch für die endothelunabhängige Vasodilationsantwort zwischen den einzelnen Antibiotika (Abbildungen 4.21 und 4.22). Es gab lediglich bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung signifikante Unterschiede durch ACh-Stimulation zwischen Clindamycin und Itraconazol bei den Konzentrationen $-\log 6$ ($p=0,048$) und $-\log 5,5$ ($p=0,047$). Diese Ergebnisse wiesen eine große Effekstärke nach Hedge's g^* auf (Tabelle 4.22). Die durch Kurvenfitting berechneten EC_{50} -Werte bei ACh-Stimulation lagen jedoch teilweise außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches oder wiesen eine große Streu-

ung im Bereich des EC_{50} -Wertes auf (Tabelle 4.21). Damit waren diese Daten wahrscheinlich wenig valide. Daher erscheinen weitere Funktionsmessungen mit größerem Stichprobenumfang nötig.

Bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch SNP-Stimulation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Antibiotika nach 24 Stunden Lagerungszeit (Abbildung 4.24). Die durch Kurvenfitting ermittelten EC_{50} -Werte zeigten bei allen einzelnen Antibiotika, dass nur eine geringe Konzentration an SNP benötigt wurde, um die halbmaximale Vasodilatation zu erreichen (Tabelle 4.23). Damit konnte bei den Arteriensegmenten durch alle verwendeten Antibiotika eine sehr gute endothelunabhängige Vasodilatationsantwort erreicht werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für Metronidazol, Gentamicin und Flucloxacillin an anderen Gefäßtypen in der Arbeit von Ebner et al. Diese Autoren untersuchten den Einfluss verschiedener Antibiotikazusätze bei der Kaltlagerung in TiProtec[®] am Beispiel der Aorta und der A. saphena der Ratte. Bei dem verwendeten Antibiotikacocktail bestehend aus Gentamicin, Flucloxacillin, Piperacillin und Metronidazol wurde weder die ACh-induzierte endothelabhängigen Vasodilatation noch die endothelunabhängige Vasodilatation durch SNP beeinflusst (Ebner et al., 2011).

5.1.3 Inhibition von Signalwegen der endothelabhängigen Vasodilatation

In dieser Arbeit wurden je nach Verfügbarkeit von Gefäßgewebe exemplarische Versuche durchgeführt, um eine Beeinflussung der Signalwege der endothelabhängigen, ACh-induzierten Vasodilatation durch antimikrobielle Dekontaminationsstoffe zu evaluieren. Für die Hemmung der eNOS, wurde L-NMMA verwendet (Palmer et al., 1988). Die nichtselektive Hemmung der Cyclooxygenase (COX) 1 und 2 wurden durch Indomethacin erzielt (Hinz & Brune, 1999). Des Weiteren wurden die K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit durch Apamin und die K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer und großer Leitfähigkeit durch Charybdotoxin gehemmt (Brayden, 1996). Alle Hemmstoffe sind durch die Referenzen belegt etablierte spezifische Inhibitoren für die genannten Signalwege. Das Ausmaß der Hemmbarkeit des jeweiligen Signalweges wurde als Hinweis darauf gewertet, dass dieser Weg nicht infolge der Kaltlagerung bzw. des Antibiotikazusatzes abgeschwächt war.

Zusammenfassend kann trotz der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Gefäßsegmente der A. mammaria interna eine Tendenz der Wirkung unterschiedlicher antimikrobieller Dekontaminationslösungen auf die Signalwege der endothelabhängigen Vasodilatation angegeben werden. Bei allen Lagerungslösungen blieben die NO-, PGI_2 - und die EDHF- bzw. 11,12-EET- abhängigen Signalwege erhalten. Zudem wurde durch den Einsatz der vier Inhibitoren (L-NMMA, Indomethacin, Apamin und Charybdotoxin) eine vollständige Blockade der ACh-induzierten Vasodilatation erzeugt. Eine Wirkungsumkehr hin zur Vasokonstriktion der Arteriensegmente, wie in der Arbeit von Garbe et al., konnte nicht beobachtet werden (Garbe, 2011). Aufgrund der hohen Streuung der Daten sind zur weiteren Evaluation der Beeinflussung der Signalwege der ACh-induzierten, endothelabhängigen Vasodilatation höhere Stichprobenumfänge nötig.

5.2 Vergleich der Stabilitätsmessungen einzelner Substanzen

Mit diesen Versuchsreihen wurde überprüft, ob die antimikrobiellen Substanzen in der Gefäßprotektionslösung TiProtec[®] über die Lagerungsdauer von 96 Stunden stabil blieben oder schon vorzeitig zerfallen. Diese Lagerungsdauer wurde gewählt, weil zur Gewebedekontamination typischerweise eine Einwirkzeit von 48 Stunden gewählt wird (Bundestag, 2007, 2012; DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH, 2015). Mit der Verdopplung der Zeit sollten harte Testbedingungen geschaffen werden. Außerdem wurde überprüft, ob die Anwesenheit des Gefäßgewebes einen Einfluss auf den Nachweis des Antibiotikums in der Lagerungslösung hat.

Nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden blieben Fluconazol, Flucloxacillin, Metronidazol und Clindamycin mittels HPLC-Analyse nachweisbar. Im Vergleich zu den verwendeten Ausgangskonzentrationen hatten sich die gemessenen Werte in Abwesenheit eines Arteriensegments erhalten. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Lagerung in Anwesenheit eines Arteriensegments erreicht (Tabelle 4.38). Dies deutet darauf hin, dass die Substanzen stabil waren und auch nicht durch enzymatische Prozesse im Gewebe oder Partitionierung in das Gewebe wesentlich beeinflusst wurden.

Itraconazol wurde mittels HPLC mit Fluoreszenz-Detektion gemessen. Auffällig war, dass nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in Anwesenheit eines Arteriensegments die Konzentration in einem Fall um 14,93% und in einer anderen Probe sogar um 58,48% reduziert war (Tabelle 4.39). In der Literatur wird angegeben, dass Itraconazol lipophil ist und sich in vielen Geweben wie Nieren, Leber, Knochen, Magen, Milz und Muskeln einlagert (De Beule & Van Gestel, 2001). Das Antimykotikum lagert sich sogar in der Nagelzellmatrix ein (Matthieu et al., 1991). Dieser therapeutische Effekt ist gewünscht, da dadurch Itraconazol am Infektionsort wirken kann und geringere therapeutische Dosen gegeben werden müssen (De Beule & Van Gestel, 2001). Die MIC₉₀ liegt in vitro für die meisten relevanten Pilzspezies bei weniger als 1000 µg/l (Rex et al., 1997; Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, 2016b). *Scedosporium apiospermum* und *Sporothrix schenckii* besitzen eine MIC₉₀ in vitro von 4000 µg/l (Johnson et al., 1998). Damit liegt die in dieser Arbeit verwendete Konzentration bzw. die gemessene Konzentration nach 96 Stunden auch in Anwesenheit eines Gefäßsegmentes im therapeutischen Bereich. Der Konzentrationsverlust nach vier Tagen Lagerung, deutet auf die Einlagerung von Itraconazol in das Gewebe der Arterienwand hin. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die Partitionierung in das Gewebe nicht durch die Analyse des Gefäßgewebes direkt geprüft wurde. Im Gegensatz zu Itraconazol war die Konzentration von Fluconazol über die Lagerungsdauer stabil (Tabelle 4.38). Dies weist darauf hin, dass die Substanz nicht im Gewebe eingelagert wird. Dem entspricht, dass es in der Literatur als hydrophil beschrieben wird (Pittrow & Penk, 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde in der Antibiotikamixtur 2 auf Itraconazol verzichtet.

Gentamicin wurde mittels photometrischer/ immunturbidimetrischer Messung (KIMS) quantifiziert. Dabei zeigte sich wie bei Itraconazol nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in Anwesenheit eines Arteriensegments eine Reduktion der Konzentration. Die Gentamicinkonzentration war in einem Fall um 24,93% und in einer anderen Probe um 41,12% reduziert (Tabelle 4.39). In der Literatur ist Gentamicin in wässriger Lösung fünf Tage stabil (Lindl & Gstraunthaler, 2008). Allgemein gilt dieses Antibiotikum als schlecht gewebebegängig durch die Darmschleimhaut, weshalb es intravenös oder intramuskulär appliziert

wird (Rote Liste Service GmbH, 2014). Dennoch konnte in der Arbeit von Schentag et al. bei Patienten eine Gewebeakkumulation 48 Stunden postmortem in der Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur, Fettgewebe, und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Schentag et al., 1977). Aminoglykoside gelangen sehr langsam u.a. über einen aktiven Transport in das Gewebe und werden intrazellulär gebunden (Schentag et al., 1977; Nix et al., 1991). Neuere Studien versuchen die Gewebegängigkeit zu erhöhen, indem Gentamicin in eine liposomale Transportform überführt wird (Rotov et al., 2012). Die EUCAST veröffentlicht für Gentamicin eine in-vitro MIC von ≤ 4 mg/l (Sandoz GmbH, 2017). Damit liegen die gemessenen Konzentrationen auch nach 96 Stunden Lagerungszeit in Anwesenheit eines Arteriensegments im therapeutischen Bereich. Hinzuweisen sei noch auf den postantibiotischen Effekt. Gentamicin kann gegen viele empfindliche Mikroorganismen wirksam sein, auch wenn die Konzentration im Plasma oder Körpergeweben während des Dosierungsintervalls teilweise unter der MHK bleibt (Buxbaum & Georgopoulos, 1996).

Taurolidin wurde mittels einer speziell im Labor etablierten colorimetrischen Testmethode bestimmt. In dieser Arbeit stieg die Konzentration an Taurolidin signifikant zwischen 2 Stunden und 48 Stunden Lagerungszeit in Anwesenheit eines Arteriensegmentes an (Abbildung 4.37). In der Arbeit von Stendel konnte mit derselben Methode ein Konzentrationsanstieg von Taurolidin nach einer Infusionstherapie in proteinfreien Seren von Patienten gemessen werden (Stendel, 2006). Das Antiseptikum liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Hydroxymethyl-Taurultam und Taurultam vor (Knight et al., 1983; Sihn et al., 1997). Bei der Etablierung der Methodik konnte nachgewiesen werden, dass das Abbauprodukt Taurin in dem verwendeten Wellenlängenbereich nicht gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.4.1). In der Arbeit von Stendel wurde vermutet, dass Taurultam und nicht Taurolidin mit der Methode bestimmt wurde (Stendel, 2006). Auch in dieser Arbeit wird vermutet, dass Taurultam statt Taurolidin nachgewiesen wurde, da es zu dem signifikanten Konzentrationsanstieg gekommen ist. Da die Hydroxymethylgruppen die antimikrobielle Wirkung besitzen, ist dieses Antiseptikum somit in der Protektionslösung TiProtec[®] wirksam.

5.3 Die Überprüfung der Toxizität mittels LDH

Die kumulative Freisetzung vom Enzym LDH, ist ein sehr sensibler und quantitativer Parameter für den Nachweis einer Zellschädigung (Korzeniewski & Callewaert, 1983). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede in der LDH-Freisetzung zwischen den Lagerungsgruppen TiProtec[®], der Antibiotikagruppe 1 und der Taurolidin 0,5%-Gruppe gibt, wenn die Lagerung über 2 Stunden, 48 Stunden und 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] erfolgte (Abbildung 4.38). Allerdings unterschieden sich die LDH-Konzentrationen sowohl in der TiProtec[®]-Gruppe als auch in der Taurolidin 0,5%-Gruppe zwischen Lagerungszeiten von 48 Stunden und 48 Stunden Lagerung in einer Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] signifikant (Tabelle 4.41). Hierbei ist die LDH-Konzentration nach der langen Lagerungszeit deutlich niedriger. Das Ergebnis kann daraus resultieren, dass die Arteriensegmente 48 Stunden in einer Dekontaminationslösung eingelagert wurden und danach für weitere fünf Tage in frische TiProtec[®]-Lösung umgelagert wurden. Eine während der Dekon-

tamination aufgetretene Zellschädigung könnte in der anschließenden Lagerung in TiProtec® eventuell wieder regeneriert sein.

Ebner et al. untersuchten den Einfluss von Antibiotika auf die LDH-Freisetzung an der A. saphena und der Aorta der Ratte. Dabei konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Anwesenheit von Antibiotika in der Lagerungslösung über 7 Tage den Anstieg der LDH-Aktivität im Überstand im Vergleich zu einer Messung nach 2 Stunden verhindert (Ebner et al., 2011).

Generell weist die geringe Freisetzung von LDH auf eine geringe Zytotoxizität der Antibiotika in den Lagerungslösungen hin. Interessant ist, dass der LDH-Anstieg auch in der Taurolidin 0,5%-Lösung gering war. Die geringe Zytotoxizität dieses Antiseptikums wurde auch in anderen Studien belegt (Schönbeck, 2006; Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Taurolidin einen Einfluss auf die Funktionalität der Gefäße hat (Abbildungen 4.1–4.4, 4.11–4.13, 4.17), dass es aber laut der LDH-Ergebnisse nicht zu Lyse der Zellen kommt.

Bei Verwendung der Taurolidinkonzentration 0,5% trat eine hohe Streuung der Daten unter Lagerung auf. Dies weist darauf hin, dass verschiedene Gefäßsegmente unterschiedlich sensitiv mit einer Schädigung reagieren. Auch die funktionellen Messungen an Gefäßsegmenten, die unter 0,5%-igem Taurolidinzusatz gelagert waren, weisen auf eine heterogene Schädigung hin (Abbildungen 4.1–4.4, 4.11–4.13, 4.17). Die Ursachen hierfür sind zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Allerdings kann ein Einsatz von Taurolidin in der Konzentration von 0,5% auf der Basis dieser Ergebnisse nicht empfohlen werden.

5.4 Grenzen dieser Studie

In dieser Studie wurden ex vivo-Analysen der Gefäßfunktion an humanen A. mammaria interna durchgeführt. Die Verwendung dieser Arterie als In-situ-Bypass zur koronaren Revaskularisation gilt als Goldstandard in der Herzchirurgie (He, 2001, 2005). Da es zwischen den unterschiedlichen Gefäßtypen und unterschiedlichen Spezies teilweise erhebliche Unterschiede gibt, sind weitere Studien an anderen humanen Gefäßgrafts für die Validierung antimikrobieller Dekontaminationslösungen nötig. Beispielsweise werden in der Gefäßchirurgie Oberschenkelarterien, Iliakalarterien oder infrarenale Aorten benötigt, welche auch von den Gewebebanken präferiert werden (Chiesa et al., 1998; Goffin et al., 1998; Kieffer et al., 2004; Dodd, 2010). Diese Gefäße waren jedoch für diese Studie nicht verfügbar.

Es wurden A. mammaria interna von multimorbiden Patienten verwendet, die oft eine umfangreiche präoperative Medikation benötigten (Abbildungen 4.42). Damit war keine optimale Qualität der Arteriensegmente gegeben, weil z.B. durch Diabetes mellitus oder Arteriosklerose die Gefäßsegmente vorgeschädigt sein können (Diener et al., 2009). Auch die Verwendung von PSS bei den Funktionsmessungen im Myographen könnte die Wandspannungsentwicklung beeinflusst haben (Zatschler et al., 2009).

In dieser Studie wurden anhand von Vorversuchen (Ebner et al., 2011) und Publikationen über die aktuellen minimalen Hemmkonzentrationen die antimikrobiell wirksamen Konzentrationen der einzelnen Substanzen festgelegt. In einem zusätzlichen Versuch mit einer Standard Nährmediumlösung (Firma Carl Roth, AE92) wurden mikrobiologische Tests durchgeführt. Getestet wurde jeweils mit einem Arterien-

segment für die Lagerungsgruppen TiProtec[®], Antibiotikamixtur 1, sowie Taurolidin in den Konzentrationen 0,5% und 0,002%. Die Arteriensegmente lagerten 48 Stunden in den Lagerungslösungen und wurden im Anschluss für 1 Woche in der Nährmediumlösung im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Gefäßsegment als Leerwert mitgeführt. Mittels eines Fotometers wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. In der Taurolidin 0,5%-Gruppe und der Antibiotikamixtur 1 konnten keine Keime nachgewiesen werden. Auch in der TiProtec[®]-Gruppe war nur ein sehr geringes Wachstum detektierbar. Allerdings zeigte die Taurolidin 0,002%-Gruppe im Vergleich ein tendenziell höheres, mikrobielles Wachstum als TiProtec[®], die Antibiotikagruppe 1 und Taurolidin 0,5%. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Arteriensegmenten wurden keine weiteren Versuche zur antimikrobiellen Wirksamkeit durchgeführt. Gerade für die geringe Konzentration von Taurolidin 0,002% sind aber weitere antimikrobielle Versuche indiziert, da diese Konzentration in der Klinik nicht etabliert ist. Die minimale Hemmkonzentration (MHK₉₀) von Taurolidin liegt nach Literaturangaben im Bereich von 0,03–0,6 mg/ml für grampositive und gramnegative Anaerobier, bei aeroben grampositive Bakterien zwischen 1–2 mg/ml und bei gramnegativen Bakterien zwischen 0,5–5 mg/ml. Für Pilze liegen die MHK₉₀-Werte zwischen 0,3–5 mg/ml (Torres-Viera et al., 2000; Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, 2016a). Die in dieser Arbeit verwendete Taurolidin 0,5%-Lösung entspricht 5 mg/ml und die Taurolidin 0,002%-Lösung entspricht 0,02 mg/ml. Letztere liegt damit nicht im sicheren Bereich, was die Dekontamination von Gewebe angeht. Diese geringe Taurolidinkonzentration zeigte aber sehr gute Resultate in den Funktionsmessungen der humanen A. mammaria interna. Dieses Beispiel zeigt sehr gut das Spannungsfeld zwischen erfolgreicher bakterieller Gewebedekontamination und den Erhalt der Gewebefunktion auf.

In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Funktionsmessungen die Maximalwerte der Wandspannungsentwicklungen aus den Originaldaten verwendet. Für die statistischen Analysen wurden die Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler genutzt. Bei der Ermittlung der maximal erreichten endothelabhängigen und endothelunabhängigen Relaxation gibt es noch die Möglichkeit durch mathematisches Fitten der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurven Maximalwerte (R_{max}) zu berechnen (Formel 6 im Abschnitt 3.3.3). Unter dem Fit wird eine mathematische Funktionsanpassung verstanden, die Messfehler oder Unsicherheiten der Messpunkte berücksichtigt. Das Ergebnis eines Fits ist immer eine Kurvenschar, in der "wahre" funktionale Zusammenhang zwischen den Datenpunkten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit liegt. Die Ermittlung der Daten z.B. des R_{max} -Wertes, hängt von der Qualität des verwendeten Modellvergleichs und der Streuung der Messdaten ab. In dieser Studie wurden mittels mathematischen Fittens zusätzlich Maximalwerte für die maximale Relaxation oder maximale Konstriktion nach Agonistenstimulation (R_{max} -Werte) berechnet. Diese Berechnungen ergaben für die R_{max} -Werte größere Standardfehler als für die Maximalwerte, die durch die Mittelwertbildung aus den Messdaten berechnet wurden. Ursache hierfür war die Variabilität in den einzelnen Konzentrations-Wirkungskurven. Folge hiervon war, dass sich die Maximalwerte, die durch den Kurvenfit aus der Summe aller konzentrationsabhängigen Einzelmessungen ergaben, teilweise erheblich von den Maximalwerten, die durch einfach Mittelwertbildung der Maximalantworten berechnet wurden, unterschieden. Wegen der geringeren Standardfehler wurde der Darstellung der Mittelwerte aus den Messdaten der Maximalwerte der Vorzug gegeben.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Aufbauend auf den guten Ergebnissen der Gefäßprotektionslösung TiProtec® (Garbe et al., 2011; Wilbring et al., 2011, 2013; Veres et al., 2016) wurden verschiedene antimikrobielle Dekontaminationslösungen an humanen A. mammaria interna getestet, um die Prozessierung von Gefäßtransplantaten zu optimieren. Sowohl die Antibiotikamixtur 1 als auch die Antibiotikamixtur 2 erzielten wie die reine TiProtec®-Lösung gute Ergebnisse bei der Überprüfung der Funktionalität der A. mammaria interna-Segmente.

Durch die Resultate dieser Studie können die Antibiotikamixturen 1 und 2 sowohl für Kurz- als auch für die Langzeitlagerung von Arteriensegmente empfohlen werden. Allerdings überzeugen die geringen Kosten für die Mixtur 2, da diese kein Flucloxacillin und kein Itraconazol enthalten. Die Stabilität der antimikrobiellen Substanzen ist bis zu einer Lagerungszeit von 96 Stunden in der TiProtec®-Lösung gegeben (Tabellen 4.38 und 4.39). Diese getesteten Lagerungszeiten decken das gesetzlich vorgeschriebene Zeitfenster für die antimikrobielle Dekontamination von 20 bis 48 Stunden ab (Jashari et al., 2007; Bisdas & Teebken, 2010; Jashari et al., 2013; Heng et al., 2015). Außerdem bieten diese langen Lagerungszeiten den Gewebebanken einen ausreichenden Zeitraum für mikrobiologische Testverfahren.

Aufgrund der Zunahme von nosokomialen Infektionen mit multiresistenten Keimen und der damit verbundenen Antibiotika-Resistenz wurde in dieser Studie das Antiseptikum Taurolidin getestet. In einer hohen Konzentration von 0,5% kann Taurolidin für die antimikrobielle Dekontamination von Gefäßgrafts nur eingeschränkt empfohlen werden. Weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Arteriensegmenten sind indiziert. Die Ergebnisse, die mit der geringeren Konzentration von Taurolidin (0,002%) erzielt wurden, sind hinsichtlich der Gefäßfunktionen vergleichbar mit denjenigen nach Lagerung in den anderen Lagerungslösungen. Jedoch sind weitere antimikrobielle Tests sind nötig, um eine antimikrobielle Wirksamkeit von Taurolidin in der Konzentration von 0,002% zu belegen.

Die Effektivität antiseptischer Lösungen wurde im gefäßchirurgischen Bereich bisher kaum untersucht (Taher et al., 2016). Allerdings gibt es Studien in denen verschiedene Antiseptika in der Wundbehandlung in vivo oder in vitro an Zellkulturen getestet wurden.

Das häufig verwendete Octenidin (Octenisept®) zeigte durch In-vitro-Tests eine erhebliche Zytotoxizität in Form ausgeprägter Gefäßschädigungen (Kramer et al., 2004). Im Jahre 2008 wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte ein Roter-Hand-Brief für Octenisept® veröffentlicht. Bei der Behandlung tiefer Stichwunden mit Octenisept® kann es zu starken Ödemen und Gewebeschädigungen kommen, wenn die Reinigung der Wunden unter Druck erfolgt und das Antiseptikum nicht wieder abfließen kann (Schülke et al., 2008). Auch in der Handchirurgie wurde von massiven Ödemen, Gewebnekrosen und chronischer Entzündung nach intraoperativer Spülung mit diesem Antiseptikum berichtet (Hülsemann & Habenicht, 2009; Franz & Vogelin, 2012).

Mittel der ersten Wahl bei der Wundbehandlung ist Polyhexanid. Dieses Antiseptikum weist keine Toxizität in einem Konzentrationsbereich von 0,2–2 µg/ml bei In-vitro-Studien mit humanen Keratozyten und Fibroblasten auf. In dieser Konzentrationseinheit wurde auch ein proliferativer Effekt auf humane Keratozyten nachgewiesen. Allerdings weist die Gruppe von Wiegand et al. darauf hin, dass Polyhex-

amid ab einer Konzentration von $> 2 \mu\text{g/ml}$ zytotoxisch ist (Wiegand et al., 2007). Auch die Gruppe von Kramer et al. wies eine konzentrations- und zeitabhängige Zytotoxizität von Polyhexanid nach. Die besten Ergebnisse der In-vitro-Tests an humanen Amnionzellen wurden zwischen 9 und 18 Tagen erzielt (Kramer et al., 2004). Dagegen konnte die Arbeit von Ince et al. einen zytotoxischen Effekt geringer Dosen von Polyhexanid auf humane Osteoblasten und Endothelzellen nachweisen (Ince et al., 2007). Weiterführende Studien an menschlichen Gefäßgrafts wären aufgrund der allgemein gültigen guten Gewebeverträglichkeit und der sehr guten antimikrobiellen Wirksamkeit von Polyhexanid indiziert (Ince et al., 2007).

Ein Antiseptikum, welches seit über 3000 Jahren wegen seiner antimikrobiellen Eigenschaften genutzt wird, ist Silber. Schon ca. 1000 Jahre vor Christus wurde Wasser durch Silber haltbar gemacht (Rai et al., 2009). Eine in der Medizin verwendete Zubereitung von Silber ist das Silbernitrat (AgNO_3). In einer aktuellen Studie von Guo et al., wird durch Silbernitrat ab einer Konzentration von $> 20 \mu\text{g/ml}$ ein direkter Zelltod von Endothelzellen der humanen Umbilicalvene induziert (Guo et al., 2016). Durch innovative Nanotechnologie konnte Silber in Form von Nanopartikeln produziert werden. Eine In-vitro-Studie von Helmlinger et al. zeigte an humanen mesenchymalen Stammzellen einen zytotoxischen Effekt von Nanosilber ab einer Konzentration von $> 12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Helmlinger et al., 2016). Weitere In-vitro-Studien an humanen Colon-Epithelzellen (Nguyen et al., 2016) oder an Endothelzellen von humanen Umbilicalvenen (Guo et al., 2016) zeigen ein erhöhte Toxizität des Nanosilbers. Es sind weitere Studien notwendig, um optimale Konfigurationen von Nanosilberpartikel zu erstellen, welche die sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit behalten und gleichzeitig nicht gewebeschädigend sind (Helmlinger et al., 2016).

Eine innovative Alternative zur Verwendung von Antibiotika wird aktuell u.a. von der Forschungsgruppe von Zschüttig und Gunzer aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus in Dresden erforscht. Es wird das antimikrobiell wirksame Mikrozin S untersucht. Dabei handelt es sich um ein kleines Peptid, welche ribosomal vom Darmbakterium *E. coli* produziert wird. Bisher wurden weltweit erst 15 Mikroazine identifiziert und sind als potentieller Antibiotika-Ersatz sehr interessant (Zschüttig et al., 2012). Über die Wirkungen auf Endothelzellen liegen bisher keine Publikationen vor.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Qualität und Vitalität von Gefäßtransplantaten bei Kaltlagerung. Optimiert wurden antimikrobiell wirksame Gefäßprotektionslösungen unter der Berücksichtigung der strengen Auflagen des Arzneimittelgesetzes (AMG). Für die umfangreichen Untersuchungen sind gesetzliche Mindestzeiten von bis zu einer Woche festgelegt. Für die antimikrobielle Dekontamination der Grafts wird ein Zeitraum zwischen 20 und 48 Stunden angegeben.

In dieser Studie wurde die bereits sehr erfolgreich getestete Protektionslösung TiProtec[®] für Kaltlagerungsbedingungen genutzt. Zur Evaluierung der Gefäßfunktionen wurde die humane A. mammaria interna verwendet. Bei den Funktionsmessungen wurden die Wandspannungsentwicklung durch die rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Konstriktion sowie die endothelabhängige und die endothelunabhängige Vasodilatation evaluiert. Getestet wurden kurze Lagerungszeiten von 2 bis 48 Stunden sowie lange Lagerungszeiten von 96 Stunden bis zu einer Woche. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Lagerung der Arteriensegmente für 48 Stunden in einer speziellen Lagerungslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] eine Verbesserung der Funktionalität bewirkte. Untersucht wurden vier antimikrobielle Dekontaminationslösungen. Neben der Vergleichsgruppe mit TiProtec[®]-Lösung ohne Zusatz, wurden als Zusätze die Antibiotikamixtur 1 (Gentamicin, Clindamycin, Flucloxacillin, Metronidazol, Fluconazol und Itraconazol), Antibiotikamixtur 2 (Gentamicin, Clindamycin, Metronidazol und Fluconazol) und das Antiseptikum Taurolidin in den Konzentrationen 0,5% und 0,002% verwendet.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bei den rezeptorunabhängigen- und rezeptorabhängigen maximalen Kontraktionsantworten sowie der maximalen endothelabhängigen Vasodilatationsantwort zwischen den beiden Antibiotikagruppen, Taurolidin 0,002% und der TiProtec[®]-Lösung bei einer Lagerungszeit bis zu einer Woche berechnet werden. Nur bei der endothelunabhängigen maximalen Vasodilatationsantwort konnten zwischen den Dekontaminationslösungen signifikante Unterschiede bei einer Lagerungszeit von 48 Stunden in der jeweiligen Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung für weitere fünf Tage in TiProtec[®] nachgewiesen werden. Die Antibiotikagruppe 1 wies eine prozentual höhere Relaxationsfähigkeit gegenüber der Antibiotikagruppe 2 und der Taurolidin 0,002%-Gruppe auf.

Innerhalb der Gruppen sank die maximal erreichte rezeptorunabhängige- und rezeptorabhängige Kontraktionsantwort sowie die maximale endothelabhängige Vasodilatationsantwort bei einer Lagerungszeit bis zu einer Woche in der Antibiotikagruppe 1 signifikant ab. Eine weitere signifikante Reduzierung der maximal erreichten Werte für die endothelabhängigen Vasodilatation war in der TiProtec[®]-Gruppe über

die Zeit zu beobachten. Insgesamt wurden aber auch über lange Lagerungszeiten stabil hohe Maximalwerte sowohl bei der Kontraktion der Grafts als auch bei der Relaxation erreicht.

Bei der Überprüfung der Stabilität der Kontraktionsplateaus unter Noradrenalinstimulation über 10 Minuten konnten signifikante Unterschiede der Antibiotikamixtur 1 ab 48 Stunden Lagerungszeit gegenüber der TiProtec[®]- und der Taurolidin 0,002%-Gruppe berechnet werden. Ab 96 Stunden Lagerungszeit unterschied sich die Antibiotikagruppe 1 auch gegenüber der Antibiotikagruppe 2 signifikant.

Bei der Evaluation der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen unter ACh-Stimulation konnte kein signifikanter Unterschied bis zu einer Woche Lagerungszeit zwischen den Lagerungsgruppen TiProtec[®], Antibiotikamixtur 1 und 2 sowie Taurolidin 0,002% berechnet werden. Insgesamt benötigten die Vergleichsgruppen höhere ACh-Konzentrationen zum Erreichen der halbmaximalen Vasodilatationswerte je länger die Gefäßsegmente in der jeweiligen Lagerungslösung lagerten.

Wie beim Erreichen der Maximalantwort der endothelunabhängigen Vasodilatationsantwort unter SNP, zeigten sich auch bei den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen signifikant bessere Relaxationsergebnisse für die Antibiotikagruppe 1 gegenüber der Antibiotikagruppe 2. Diese betraf die Lagerungszeit von 48 Stunden in der Dekontaminationslösung mit anschließender Umlagerung der Gefäße für weitere fünf Tage in frische TiProtec[®]-Lösung. Interessant ist, dass bei der Erzielung der halbmaximalen Vasodilatationsantwort die Gefäßsegmente unter SNP-Stimulation im Gegensatz zu ACh-Stimulation auch nach einer Woche eine genauso niedrige SNP-Konzentration wie nach 2 Stunden Lagerungszeit benötigten.

Die Lagerung in der Taurolidin 0,5%-Lösung ergab zu wenige funktionsfähige Gefäße, sodass die Streuung der Daten zu groß waren, um diese statistisch auszuwerten. Hier sind größere Stichprobenumfänge notwendig. Vereinzelt signifikante Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass Taurolidin in der höheren verwendeten Konzentrationen die Funktionalität negativ beeinflusst.

In weiterführenden Untersuchungen zur Beeinflussung verschiedener Botenstoffe endothelabhängiger Vasodilatation konnte nachgewiesen werden, dass alle Lagerungslösungen die NO-, PGI₂- und die EDHF- bzw. 11,12-EET- abhängigen Signalwege erhalten. Bei Einsatz von vier Inhibitoren (L-NMMA, Indomethacin, Apamin und Charybdotoxin) zeigte sich eine vollständige Blockade der ACh-induzierten Vasodilatation. Das zeigt, dass aus der Summe dieser vier Beiträge die beobachtete Relaxation quantitativ vollständig erklärt werden kann.

Bei den Stabilitätsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass die antimikrobiellen Substanzen auch bei Anwesenheit eines Arteriensegmentes in der TiProtec[®]-Lösung über 96 Stunden stabil blieben. Die verwendeten Konzentrationen der Antibiotika und der Taurolidin 0,5%-Lösung befanden sich im Bereich der minimalen Hemmkonzentrationen der typischen Erregerspektren von Gefäßtransplantaten. Ob Taurolidin in der Konzentration 0,002% eine ausreichende antimikrobielle Wirksamkeit hat, muss in Folgestudien belegt werden. Die Messungen der Laktatdehydrogenase-Konzentrationen belegten für alle Lagerungsgruppen eine sehr geringe Zytotoxizität auf die Zellen der humanen A. mammaria interna. Durch die Ergebnisse dieser Studie eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Kaltlagerung von vaskulären Allografts. Unter dem Gesichtspunkt der Erhaltung von Vitalität und einer damit verbundenen besseren Qualität der Gefäßgrafts konnten zwei Antibiotikamixturen definiert werden, die einerseits ein breites Erregerspektrum abdecken und andererseits geringe Gewebetoxizität aufweisen und so einen sehr guten Funktionserhalt von Gefäßen ermöglichen.

6.2 Summary

The aim of the present doctoral thesis was to enhance the quality and vitality of vascular grafts in case of cold storage. Based on the very strict requirements of the pharmaceutical law the antimicrobial vessel-protective liquid solution was optimized. By law a minimum storage period of one week is given for the extensive studies performed in this thesis. However, for the antimicrobial decontamination of grafts a period between 20 to 48 hours is stated.

In the present study the already very successful tested protective solution TiProtec[®] was used for cold storage condition. For evaluation purposes of the vascular function the human A. mammaria interna was utilized. The wall tension development was evaluated in functional measurements by receptor dependent and independent constriction and endothelial dependent and independent vasodilatation. Short and long storage periods of 2 to 48 hours and 96 hours to one week were tested. Furthermore, a functionality investigation of arteria segments in case of a first 48 hours storage in a special solution followed by five days storage in TiProtec[®] was performed as well. Four anti-microbial decontamination solutions were examined using TiProtec[®] without additives as a reference solution. Additionally, additives named as antibiotics mixture 1 (Gentamicin, Clindamycin, Flucloxacillin, Metronidazol, Fluconazol and Itracozazol), antibiotics mixture 2 (Gentamicin, Clindamycin, Metronidazol and Fluconazol) and antiseptic Taurolidin with a concentration of 0,5% and 0,002% added to TiProtec[®] were utilized.

No significant difference was observed with respect to receptor dependent and independent maximum contraction responses and in endothelial dependent vasodilatation reactions between both groups of antibiotics, Taurolidin 0,002% and pure TiProtec[®] with a storage period of up to one week. Significant differences were demonstrated in maximum endothelial independent vasodilatation for the decontamination solutions with a storage time of 48 hours and a subsequent storage for additional five days in TiProtec[®]. Antibiotics group 1 showed a higher percentage in relaxation behavior compared to antibiotics group 2 and Taurolidin 0,002%. Within the groups a significant decrease in maximal receptor dependent and independent contractions as well as endothelial dependent vasodilatation was observed for antibiotics group 1 in case of one week storage time. A further significant reduction of maximal endothelial dependent vasodilatation was demonstrated in the group of TiProtec[®] over time. Overall it was shown that contraction of grafts and relaxation remain stable for extended storage periods.

Significant differences have been calculated for the stability of contraction plateau by noradrenalin stimulation over a period of 10 minutes with respect to antibiotics group 1 versus TiProtec[®] and Taurolidin 0,002% when storage for 48 hours was applied. For 96 hours storage time antibiotics group 1 also differed significantly from group 2.

No significant differences for concentration-response relationships with ACh stimulation were calculated for TiProtec[®], antibiotics group 1 and 2 and Taurolidin 0,002% when stored for one week. Altogether, the vessels required increasing ACh-concentrations to achieve halfmaximal vasodilatation when vessel storage time were prolonged in the respective solution.

Similar to the maximum responses of endothelial independent vasodilatation with SNP, significantly improved relaxations were observed for concentration-response relationships of antibiotics group 1 versus

group 2. This difference affects storage times of 48 hours in decontamination solution and a subsequent vessel rearrangement in fresh TiProtec[®] for another five days. It is interesting to note that for half-maximal vasodilatation responses with SNP similar low concentrations are needed after one week storage as after 2 hours storage. This contrasts with results using ACh stimulation for assessment of endothelial-dependent relaxation.

The storage in Taurolidin 0,5% resulted recovery of only a few functionally acceptable vessels. The broad scattering of experimental data prohibited a meaningful statistical evaluation. A larger sample size would be required. Singular significant changes of vessel function, however, indicate a negative influence of Taurolidin used at the higher concentration.

Further investigations were undertaken to assess the maintained contribution of different messengers for endothelial dependent vasodilatation under the storage conditions applied. All storage solutions used did not affect the NO-, PGI₂ and EDHF- respectively 11,12-EET-signaling pathways. This was objectified using the effectiveness specific pharmacological inhibitors (L-NMMA, Indomethacin, Apamin and Charybdotoxin) to fractionally block the Ach-induced vasodilatation. The data show that the full extent of ACh-induced vasodilatation may be explained by the sum of the above-mentioned four contributions.

Stability measurements proved that antimicrobial substances remain stable in presence of an artery segment being stored in TiProtec[®] for 96 hours. The concentrations used in cases of antibiotics and Taurolidin 0,5% solution were in the range of minimum inhibitory concentrations for a typical pathogen spectrum relevant for of vascular grafts. In subsequent studies it has to be proven whether Taurolidin with a concentration of 0,002% has a sufficient antimicrobial efficacy.

The concentration measurements of lactate dehydrogenase verified for all storage solutions a low cytotoxicity for the cells of human A. mammaria interna. This study indicates new cold storage opportunities for vascular allografts. With respect to maintained vessel graft vitality reflecting quality of vessel grafts two antibiotics mixtures were defined. These mixtures cover a wide spectrum of pathogenes while exerting low tissue toxicity resulting in a superior function preservation of vessels.

Literatur

- Alamanni F, Parolari A, Visigalli R, Bussolati O, Rubini P, Sala R, Bonati L, Gazzola GC, Biglioli P, Dall'Asta V. 2002. Endothelial cell injury induced by preservation solutions: a confocal microscopy study . *The Annals of Thoracic Surgery* 73:1606–14; discussion 1614–5.
- Aldous JA, Olson CJ. 2001. Managing patients on warfarin therapy: a case report . *Special care in dentistry: official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry* 21:109–112.
- Ali AT, Modrall JG, Hocking J, Valentine RJ, Spencer H, Eidt JF, Clagett GP. 2009. Long-term results of the treatment of aortic graft infection by in situ replacement with femoral popliteal vein grafts . *Journal of Vascular Surgery* 50:30. Doi:10.1016/j.jvs.2009.01.008.
- Aper T, Haverich A, Teebken OE. 2008. Der Traum vom idealen Bypassmaterial in der Gefäßchirurgie . *Gefäßchirurgie* 13:87. Doi:10.1007/s00772-008-0587-7.
- Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED. 2003. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels . *Circulation* 107:769–776.
- Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. 1986. Endothelium dependent inhibition of platelet aggregation . *British journal of pharmacology* 88:411. Doi:10.1111/j.1476-5381.1986.tb10218.x.
- Baldo BA, Pham N, Weiner J. 1995. Detection and side-chain specificity of ige antibodies to flucloxicillin in allergic subjects . *Journal of Molecular Recognition* 8:171. Doi:10.1002/jmr.300080302.
- Barner HB, DeWeese JA. 1967. Aneurysmal degeneration of arterial homografts . *American Heart Journal* 73:289–291.
- Barry MM, Foulon P, Touati G, Ledoux B, Sevestre H, Carmi D, Laude M. 2003. Comparative histological and biometric study of the coronary, radial and left internal thoracic arteries . *Surgical and radiologic anatomy: SRA* 25:284–289.
- Belzer FO, Southard JH. 1988. Principles of solid-organ preservation by cold storage . *Transplantation* 45:673. Doi:10.1097/00007890-198804000-00001.
- Benvenisty AI, Voorhees ABJ. 1994. A vascular surgical pioneer and his legacy . *P&S Medical Review* 2 .

- Bisdas T, Brecht M, Pichlmaier M, Aper T, Wilhelmi M, Bisdas S, Haverich A, Teebken OE. 2010. Eight-year experience with cryopreserved arterial homografts for the in situ reconstruction of abdominal aortic infections . *Journal of Vascular Surgery* 52:323. Doi:10.1016/j.jvs.2010.02.277.
- Bisdas T, Teebken OE. 2010. Optimierung des mikrobiologischen und histologischen Status der humanen Allografts . *Gefäßchirurgie* 15:448. Doi:10.1007/s00772-010-0843-5.
- Bisdas TE, Mattner F, Ott E, Pichlmaier MA, Wilhelmi M, Haverich A, Teebken OE. 2009. Significance of infection markers and microbiological findings during tissue processing of cryopreserved arterial homografts for the early postoperative course . *VASA. Zeitschrift für Gefäßkrankheiten* 38:365–373.
- Braumann C. 2006. Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case . *World Journal of Surgical Oncology* 4:34. Doi:10.1186/1477-7819-4-34.
- Brayden JE. 1996. Potassium channels in vascular smooth muscle . *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23:1069. Doi:10.1111/j.1440-1681.1996.tb01172.x.
- Breier AC, Schröder C, Gastmeier P, Geffers C. 2016. Postoperative Wundinfektionen in der Gefäßchirurgie-Wo stehen wir? *Gefäßchirurgie* 21:138. Doi:10.1007/s00772-016-0132-z.
- Bundestag. 2007. Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebe-gesetz). *Bundesgesetzblatt I* (35): 1574–1594 .
- Bundestag. 2012. Gesetz zur Änderung des Transplantationsgesetzes, *Bundesgesetzblatt I* (35) .
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. 2002. EDHF: bringing the concepts together . *Trends in pharmacological sciences* 23:374–380.
- Buxbaum A, Georgopoulos A. 1996. Postantibiotic effect of ceftriaxone and gentamicin alone and in combination on *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus viridans* . *Infection* 24:459. Doi:10.1007/BF01713048.
- Campbell WB, Fleming I. 2010. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses . *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 459:881–895.
- Carrel A, Guthrie CC. 1906. Uniterminal and biterminal venous transplantation . *Surg Gynecol Obstet* 2:266–273.
- Caruso F, Darnowski JW, Opazo C, Goldberg A, Kishore N, Agoston ES, Rossi M. 2010. Taurolidine antiadhesive properties on interaction with *E. coli*; its transformation in biological environment and interaction with bacteria cell wall . *PLoS ONE* 5:e8927. Doi:10.1371/journal.pone.0008927.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation . *Journal of cellular physiology* 184:409. Doi:10.1002/1097-4652(200009)184:3<409::AID-JCP16>3.0.CO;2-K.
- Chiesa R, Astore D, Piccolo G, Melissano G, Jannello A, Frigerio D, Agrifoglio G, Bonalumi F, Corsi G, Costantini Brancadoro S. 1998. Fresh and cryopreserved arterial homografts in the treatment of

prosthetic graft infections: experience of the Italian Collaborative Vascular Homograft Group . *Annals of Vascular Surgery* 12:457–462.

Cirino G. 1998. Multiple controls in inflammation: extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase . *Biochemical pharmacology* 55:105. Doi:10.1016/S0006-2952(97)00215-3.

Darnowski JW, Goulette FA, Cousens LP, Chatterjee D, Calabresi P. 2004. Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer . *Cancer chemotherapy and pharmacology* 54:249. Doi:10.1007/s00280-004-0806-1.

De Beule K, Van Gestel J. 2001. Pharmacology of itraconazole . *Drugs* 61:27–37.

de Groot H. 1992. Isolated cells in the study of the molecular mechanisms of reperfusion injury . *Toxicology letters* 63:111. Doi:10.1016/0378-4274(92)90002-2.

de Groot H. 1998. Ein Zusammenspiel vieler Variablen - Die Pathobiochemie der Gewebeschädigung bei der Transplantation, UNIKATE: Berichte aus Forschung und Lehre, Heft 10: Medizin - 25 Jahre Transplantationsmedizin in Essen .

DGFG, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation mbH. 2015. Deutsche Gesellschaft für Gewebespende, Jahresbericht 2014, Hannover [Aktualisiert am: Juli 2015, Aufruf am 16.09.2017] . URL: <http://www.gewebenetzwerk.de/wp-content/uploads/2015/12/Jahresbericht-2014.pdf>.

Diener H, Larena-Avellaneda A, Debus ES. 2009. Postoperative Komplikationen in der Gefäßchirurgie . *Der Chirurg* 80:814. Doi:10.1007/s00104-009-1692-1.

Diniz CG, Santos SG, Pestana ACNR, Farias LM, Carvalho MAR. 2000. Chromosomal breakage in the *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment . *Anaerobe* 6:149. Doi:10.1006/anae.2000.0332.

Dodd PDF. 2010. What tissue bankers should know about the use of allograft blood vessels . *Cell and Tissue Banking* 11:3. Doi:10.1007/s10561-009-9149-9.

Douthwaite S. 1992. Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA . *Nucleic acids research* 20:4717–4720.

Ebner A, Zatschler B, Deußen A. 2011. Evaluation of cold storage conditions for vessels obtained from donor rats after cardiac death . *Journal of Vascular Surgery* 54:1769. Doi:10.1016/j.jvs.2011.06.080.

Erb F, Febvay N, Imbenotte M. 1982. Structural investigation of a new organic antiseptic: taurolidine: a spectroscopic study of its stability and equilibria in various solvents . *Talanta* 29:953. Doi:10.1016/0039-9140(82)80161-6.

Erhard J. 1998. Organkonservierung und Organtransplantation am Beispiel der Leber . *Essener Unikate* 10:76–83.

Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz. 2016a. Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, Taurolin [Aktualisiert am: 17.07.2017, Aufruf am 16.09.2017] . URL: <https://compendium.ch/mpro/mnr/1799/html/de>.

- Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz. 2016b. Sporanox orale Lösung 10mg/ml [Aktualisiert am: 24.03.2016, Aufruf am: 16.09.2017] . URL: <https://compendium.ch/mpro/mnr/9164/html/de>.
- Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz. 2017a. Floxapen [Aktualisiert am: 25.07.2017, Aufruf am 16.09.2017] . URL: <https://compendium.ch/mpro/mnr/1215/html/de>.
- Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz. 2017b. Metrolag [Aktualisiert am: 14.09.2017, Aufruf am: 25.09.2017] . URL: <https://compendium.ch/mpro/mnr/15024/html/de>.
- Feletou M, Vanhoutte P. 2005. EDHF: the complete story . CRC Press, Taylor and Francis group, Boca Raton, New York, S. 1-36.
- Fellmer P, Matia I, Tautenhan HM, Jonas S. 2011. Auswirkung des Gewebegesetzes auf die Anwendung frischer arterieller Homografts . *Gefäßchirurgie* 16:403. Doi:10.1007/s00772-011-0953-8.
- Franz T, Vogelin E. 2012. Aseptic tissue necrosis and chronic inflammation after irrigation of penetrating hand wounds using Octenisept® . *The Journal of hand surgery, European volume* 37:61–64.
- Funke M. 2014. Bestimmung der in vitro Aktivität von Clindamycin, Imipenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam gegenüber sensiblen und resistenten *Bacteroides fragilis* Stämmen mittels Absterbekinetik . Universität Leipzig, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Dissertation.
- Furchgott RF. 1981. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators . *Trends in pharmacological sciences* 2:173. Doi:10.1016/0165-6147(81)90303-5.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine . *Nature* 288:373–376.
- Galambos B, Csonge L, von Versen R, Olah A, Tamas L, Zsoldos P. 2005. Preservation of vein allograft viability during long-term storage . *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 37:60–67.
- Garbe S. 2011. Experimentelle Untersuchungen zur Protektion von Mammaria-Gefäßen bei Kaltlagerung unter besonderer Berücksichtigung der Endothelfunktion. Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Dissertation .
- Garbe S, Zatschler B, Muller B, Dieterich P, Ebner A, Rauen U, Matschke K, Deußen A. 2011. Preservation of human artery function following prolonged cold storage with a new solution . *Journal of vascular surgery* 53:1063–1070.
- Ghannoum MA, Rice LB. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance . *Clinical microbiology reviews* 12:501–517.
- Goffin YA, Grandmougin D, Wozniak G, Keppenne V, Nevelsteen A, Vogt P, Van Damme H, Stankowiak C, Dapper F, De Geest R. 1998. Banking and distribution of large cryopreserved arterial homografts in Brussels: assessment of 4 years of activity by the European Homograft Bank (EHB) with reference to

implantation results in reconstruction of infected infrarenal arterial prostheses and mycotic aneurysms . *Vascular and Endovascular Surgery* 32:19–32.

Gournier JP, Adham M, Favre JP, Raba M, Bancel B, Lepetit JC, Barral X. 1993. Cryopreserved arterial homografts: preliminary study . *Annals of Vascular Surgery* 7:503. Doi:10.1007/BF02000144.

Goyanes J. 1906. Substitution plastica de las artenas por las venas, o arterioplastica venosa, aplicada, como nuevo metodo, al tratamiento de los aneurismas . *Siglo Med* 346 .

Guo H, Zhang J, Boudreau M, Meng J, Yin JJ, Liu J, Xu H. 2016. Intravenous administration of silver nanoparticles causes organ toxicity through intracellular ROS-related loss of inter-endothelial junction . *Particle and fibre toxicology* 13:1.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing . *Cell Metabolism* 1:401–408.

Hach W. 2012. *Geschichte der Gefäßmedizin: Operative und interventionelle Gefäßmedizin* , chap. 1.2.5. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 16–20.

He GW. 2001. Arterial grafts for coronary surgery: vasospasm and patency rate . *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 121:431. Doi:10.1067/mtc.2001.113593.

He GW. 2005. Endothelial function related to vascular tone in cardiac surgery . *Heart, Lung and Circulation* 14:13. Doi:10.1016/j.hlc.2004.11.003.

Hedberg M, Nord CE, ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. 2003. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe . *Clinical Microbiology and Infection* 9:475. Doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00674.x.

Helmlinger J, Sengstock C, Groß-Heitfeld C, Mayer C, Schildhauer T, Köller M, Epple M. 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects . *RSC Advances* 6:18490–18501.

Heng WL, Madhavan K, Wee P, Seck T, Lim YP, Lim CH. 2015. Banking of cryopreserved iliac artery and vein homografts: clinical uses in transplantation . *Cell and Tissue Banking* 16:235–242.

Herring M, Gardner A, Glover J. 1978. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium . *Surgery* 84:498–504.

Hickethier T, Dammrich J, Silber RE, Finster S, Elert O. 1999. Ultrastructural investigations for reducing endothelial cell damage of vein grafts during CABG-operation and practical consequences . *The Journal of cardiovascular surgery* 40:71–76.

Hinz B, Brune K. 1999. COX-1 und COX-2: Funktionen und pharmakologische Beeinflussung . *Pharmazie in unserer Zeit* 28:21. Doi:10.1002/pauz.19990280108.

Hirano K, Derkach DN, Hirano M, Nishimura J, Kanaide H. 2003. Protein kinase network in the regu-

lation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain . *Molecular and cellular biochemistry* 248:105. Doi:10.1023/A:1024180101032.

Hitchcock CA. 1991. Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals . *Biochemical Society transactions* 19:782–787.

Hitchcock CA. 1993. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents . *Biochemical Society transactions* 21:1039–1047.

Hülsemann W, Habenicht R. 2009. Schwere Nebenwirkungen nach Octenisept®-Spülung von Perforationswunden im Kindesalter . *Handchirurgie - Mikrochirurgie - Plastische Chirurgie* 41:277–282.

Hummel-Kemmer P. 2005. Resistenztestung von Pilzen: Untersuchungen zur Epidemiologie, zum Vergleich des Verfahrens nach DIN und NCCLS, sowie zur Evaluation des YeastOne-Systems . Universität Würzburg, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Dissertation.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:9265–9269.

Ince A, Schutze N, Hendrich C, Jakob F, Eulert J, Lohr JF. 2007. Effect of polyhexanide and gentamicin on human osteoblasts and endothelial cells . *Swiss medical weekly* 137:139–145.

Isoherranen N, Kunze KL, Allen KE, Nelson WL, Thummel KE. 2004. Role of itraconazole metabolites in CYP3A4 inhibition . *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32:1121–1131.

Jacobi CA, Peter FJ, Wenger FA, Ordemann J, Müller JM. 1999. New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat . *Digestive surgery* 16:393. Doi:10.1159/000018754.

Jacobi CA, Sabat R, Ordemann J, Wenger F, Volk HD, Müller JM. 1997. Peritoneal instillation of taurolidine and heparin for preventing intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in laparoscopic operations in the rat model . *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 382:S31–6.

Jashari R, Tabaku M, Van Hoeck B, Cochéz C, Callant M, Vanderkelen A. 2007. Decontamination of heart valve and arterial allografts in the European Homograft Bank (EHB): comparison of two different antibiotic cocktails in low temperature conditions . *Cell and Tissue Banking* 8:247. Doi:10.1007/s10561-007-9040-5.

Jashari R, Van Hoeck B, Ngakam R, Goffin Y, Fan Y. 2013. Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels . *Cell and Tissue Banking* 14:589–599.

Jashari R, Van Hoeck B, Tabaku M, Vanderkelen A. 2004. Banking of the human heart valves and the arteries at the European homograft bank (EHB) - Overview of a 14-year activity in this International Association in Brussels* . *Cell and Tissue Banking* 5:239. Doi:10.1007/s10561-004-1441-0.

Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin b against filamentous fungi . *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 42:741–745.

- Kadurugamuwa JL, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1993. Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 175:5798–5805.
- Kieffer E, Bahnini A, Koskas F, Ruotolo C, Le Blevec D, Plissonnier D. 1993. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *Journal of vascular surgery* 17:349–55; discussion 355–6.
- Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahnini A. 2004. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *Journal of Vascular Surgery* 39:1009. Doi:10.1016/j.jvs.2003.12.040.
- Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. 2004. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 27:357. Doi:10.1016/j.ejvs.2003.12.027.
- Knight BI, Skellern GG, Browne MK, Pfirmann RW. 1981. The characterisation and quantitation by high-performance liquid chromatography of the metabolites of taurolin [letter]. *British journal of clinical pharmacology* 12:439. Doi:10.1111/j.1365-2125.1981.tb01245.x.
- Knight BI, Skellern GG, Smail GA, Browne MK, Pfirmann RW. 1983. NMR studies and GC analysis of the antibacterial agent taurolidine. *Journal of pharmaceutical sciences* 72:705. Doi:10.1002/jps.2600720630.
- Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal* 298 (Pt 2):249–258.
- Kopf D, Lehnert H, Schulz C. 2001. *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*, chap. 13.1.6 Katecholamine-Einfluss auf die Zielzelle. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 525–526.
- Korzeniewski C, Callewaert DM. 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 64:313. Doi:10.1016/0022-1759(83)90438-6.
- Kowaluk EA, Seth P, Fung HL. 1992. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 262:916–922.
- Kramer A, Roth B, Muller G, Rudolph P, Klocker N. 2004. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin pharmacology and physiology* 17:141–146.
- Kupriyanov VV, Yang L, Deslauriers R. 1996. Cytoplasmic phosphates in Na(+)-K+ balance in KCN-poisoned rat heart: a ⁸⁷Rb-, ²³Na-, and ³¹P-NMR study. *The American Journal of Physiology* 270:H1303–11.
- Land KM, Johnson PJ. 1999. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2:289–294.

- Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P, Falini B, Grignani F, Peri G, Mantovani A, Pelicci PG. 1992. Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1 . *Blood* 80:2835–2842.
- Lehle K, Hoenicka M, Jacobs VR, Schmid FX, Birnbaum DE. 2006. Identification and reduction of cryoinjury in endothelial cells: a first step toward establishing a cell bank for vascular tissue engineering . *Tissue engineering* 12:3439–3447.
- Leigh DA. 1981. Antibacterial activity and pharmacokinetics of clindamycin . *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 7 Suppl A:3–9.
- Lewis C, Clapp HW, Grady JE. 1963. In vitro and in vivo evaluation of lincomycin, a new antibiotic . *Antimicrob. Agents & Chemoth* 1962:570–582.
- Linder MM, Ott W, Wesch G, Wicki O, Marti MC, Moser G. 1981. Die Behandlung der eitrigen Bauchfellentzündung . *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 353:241–250.
- Lindl T, Gstraunthaler G. 2008. Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank , chap. 2.6 Antibiotika (Verwendung von Antibiotika in der Zellkultur). 6 edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 35–36.
- Litvan GG. 1972. Mechanism of cryoinjury in biological systems . *Cryobiology* 9:182. Doi:10.1016/0011-2240(72)90030-2.
- Liu ZG, Ge ZD, He GW. 2000. Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein . *Circulation* 102:III296–301.
- Lofmark S, Edlund C, Nord CE. 2010. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections . *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 Suppl 1:S16–23.
- Lofmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. 2005. Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:1253–1256.
- Ma Y, Zhang P, Li J, Lu J, Ge J, Zhao Z, Ma X, Wan S, Yao X, Shen B. 2015. Epoxyeicosatrienoic acids act through TRPV4-TRPC1-K Ca 1.1 complex to induce smooth muscle membrane hyperpolarization and relaxation in human internal mammary arteries . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852:552. Doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.010.
- MacAlpin RN. 1980. Correlation of the location of coronary arterial spasm with the lead distribution of ST segment elevation during variant angina . *American Heart Journal* 99:555–564.
- Magerlein BJ, Birkenmeyer RD, Kagan F. 1966. Chemical modification of lincomycin . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 6:727–736.
- Matthieu L, De Doncker P, Cauwenbergh G, Woestenborghs R, van de Velde V, Janssen PA, Dockx P.

1991. Itraconazole penetrates the nail via the nail matrix and the nail bed-an investigation in onychomycosis . *Clinical and experimental dermatology* 16:374. Doi:10.1111/j.1365-2230.1991.tb00405.x.
- Mertens S, Noll T, Spahr R, Krutzfeldt A, Piper HM. 1990. Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia . *The American Journal of Physiology* 258:H689–94.
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. 2008. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium . *Experimental physiology* 93:141. Doi:10.1113/expphysiol.2007.038588.
- Miwa K, Fujita M, Sasayama S. 2005. Recent insights into the mechanisms, predisposing factors, and racial differences of coronary vasospasm . *Heart and vessels* 20:1–7.
- Möhler T. 2008. Inhibition of endothelial cell adhesion and in vitro angiogenesis by taurolidine . *Cancer Therapy* 6:623.
- Molnár GF, Nemesa A, Kékesia V, Monosb E, Nádasyb GL. 2010. Maintained geometry, elasticity and contractility of human saphenous vein segments stored in a complex tissue culture medium . *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 40:88. Doi:10.1016/j.ejvs.2010.01.008.
- Moncada S, Erusalimsky JD. 2002. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:214. Doi:10.1038/nrm762.
- Moncada S, Higgs EA. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology . *British journal of pharmacology* 147:S193. Doi:10.1038/sj.bjp.0706458.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication . *Biochemical pharmacology* 38:1709. Doi:10.1016/0006-2952(89)90403-6.
- Moncada S, Vane JR. 1978. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin . *Pharmacological reviews* 30:293–331.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation . *Pharmacology&Therapeutics* 110:371. Doi:10.1016/j.pharmthera.2005.08.007.
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. 2005. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25:274–278.
- Mulvany MJ, Halpern W. 1976. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ . *Nature* 260:617–619.
- Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species . *Biochemical Journal* 417:1. Pmid:19061483; doi:10.1042/BJ20081386.
- Nash T. 1952. Colorimetric determination of formaldehyde under mild conditions . *Nature* 170:976. Doi:10.1038/170976a0.
- Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction . *The Biochemical journal* 55:416–421.

- Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen. 2012. Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS), Modul OP-KISS [Aktualisiert am: 09.05.2012, Aufruf am: 17.09.2017] . URL: http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/op/200701_201112_OP_reference.pdf.
- Nelson MT, Quayle JM. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle . *The American Journal of Physiology* 268:C799–822.
- Nguyen KC, Richards L, Massarsky A, Moon TW, Tayabali AF. 2016. Toxicological evaluation of representative silver nanoparticles in macrophages and epithelial cells . *Toxicology in Vitro* 33:163–173.
- Niwa T, Shiraga T, Takagi A. 2005. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes . *Biological & pharmaceutical bulletin* 28:1805–1808.
- Nix DE, Goodwin SD, Peloquin CA, Rotella DL, Schentag JJ. 1991. Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35:1947–1952.
- Olsson R, Wiholm BE, Sand C, Zettergren L, Hultcrantz R, Myrhed M. 1992. Liver damage from flucloxacillin, cloxacillin and dicloxacillin . *Journal of hepatology* 15:154. Doi:10.1016/0168-8278(92)90029-O.
- Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, Ghannoum MA, Filler SG. 1998. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei* . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:2645–2649.
- Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation . *Biochemical and biophysical research communications* 153:1251. Doi:10.1016/S0006-291X(88)81362-7.
- Petrovic L, Schlegel KA, Ries J, Park J, Diebel E, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. 2003. In-vitro-Effekt von Taurolidin auf Plattenepithelkarzinomzellen der Mundhöhle . *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 7:102. Doi:10.1007/s10006-003-0452-5.
- Pfirrmann RW. 1985. Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen . *Taurolin-ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen*. 1st edn Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, pp. 3–23.
- Pittrow L, Penk A. 1996. Plasma- und Gewebekonzentrationen von Fluconazol: Diskussion der Breakpoint-Problematik . *Mycoses* 39:58–65.
- Pupka A, Skora J, Janczak D, Plonek T, Marczak J, Szydelko T. 2011. In situ revascularisation with silver-coated polyester prostheses and arterial homografts in patients with aortic graft infection-a prospective, comparative, single-centre study . *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 41:61. Doi:10.1016/j.ejvs.2010.10.005.

- Rai M, Yadav A, Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials . *Biotechnology Advances* 27:76–83.
- Ramwell PW, Leovey EM, Sintetos AL. 1977. Regulation of the arachidonic acid cascade . *Biology of reproduction* 16:70–87.
- Rauen U, de Groot H. 1998. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells . *Free Radical Biology and Medicine* 24:1316. Doi:10.1016/S0891-5849(97)00456-5.
- Rauen U, de Groot H. 2002. Mammalian cell injury induced by hypothermia the emerging role for reactive oxygen species . *Biological chemistry* 383:477. Doi:10.1515/BC.2002.050.
- Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. 2003. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron . *Free Radical Biology and Medicine* 35:1664. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.018.
- Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. 2000. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis–evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation . *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14:1953–1964.
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. 1999. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species . *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:155–168.
- Reddy S, Kumar P, Prasad K. 2011. Histomorphometric and sympathetic innervation of the human internal thoracic artery . *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 66:131–136.
- Reiche D. 2003. *Roche Lexikon Medizin* . 5. ed. Urban & Fischer, München.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards . *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 24:235–247.
- Rote Liste Service GmbH. 2011. Flucloxacillin 1g/ -2g, Stragen Pharma GmbH [Aktualisiert am: September 2011, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/006159>.
- Rote Liste Service GmbH. 2013. Metronidazol-Infusionslösung 0,5%, Baxter [Aktualisiert am: Juni 2013, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/009461>.
- Rote Liste Service GmbH. 2014. Gentamicin-ratiopharm SF [Aktualisiert am: Januar 2014, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/000930>.
- Rote Liste Service GmbH. 2015. Sempera Liquid 10mg/ml, Janssen [Aktualisiert am: Januar 2015, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/002209>.

- Rote Liste Service GmbH. 2016. Clindamycin Kabi 150 mg/ml Injektionslösung, Fresenius Kabi [Aktualisiert am: März 2016, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/010066>.
- Rote Liste Service GmbH. 2017. Fluconazol-ratiopharm 2mg/ml Infusionslösung [Aktualisiert am: März 2017, Aufruf am: 13.09.2017] . URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/009487>.
- Rotov KA, Tikhonov SN, Alekseev VV, Snatnikov EA. 2012. Pharmacokinetics of liposomal gentamicin . *Bulletin of experimental biology and medicine* 153:475. Doi:10.1007/s10517-012-1744-2.
- Rudin A, Healey A, Phillips CA, Gump DW, Forsyth BR. 1970. Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture . *Applied Microbiology* 20:989–990.
- Sabik JF, Lytle BW, Blackstone EH, Houghtaling PL, Cosgrove DM. 2005. Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system . *The Annals of Thoracic Surgery* 79:544. Doi:10.1016/j.athoracsur.2004.07.047.
- Sandoz GmbH. 2017. Gentamicin Sandoz 40 mg-Ampullen [Aktualisiert am: März 2017, Aufruf am: 17.09.2017] . URL: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/59/1-18859.pdf>.
- Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. 2005. Inducible Metronidazole Resistance in nim-Positive and nim-Negative *Bacteroides fragilis* Group Strains after Several Passages Metronidazole Containing Columbia Agar Plates . *Infection* 33:368. Doi:10.1007/s15010-005-5061-9.
- Schentag JJ, Jusko WJ, Vance JW, Cumbo TJ, Abrutyn E, DeLattre M, Gerbracht LM. 1977. Gentamicin disposition and tissue accumulation on multiple dosing . *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 5:559. Doi:10.1007/BF01059684.
- Schönbeck M. 2006. Der Einfluss einer intravenösen Bolusapplikation versus einer Infusionstherapie von 1%, 2% und 3% Taurolidinlösung in der konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei Ratten . *Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Dissertation*.
- Schülke, GmbH M, für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) B. 2008. Wichtige Information zur Arzneimittelsicherheit von Octenisept® (Octenidindihydrochlorid, Phenoxyethanol) Oedematöse Schwellungen und Gewebeschädigungen nach Einbringen unter Druck in Stichwunden bei handchirurgischen Eingriffen [Aktualisiert am: 07.02.2008, Aufruf am: 25.09.2017] . URL: <https://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2008/20080213.pdf>.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. 2001. Taming platelets with cyclic nucleotides . *Biochemical pharmacology* 62:1153. Doi:10.1016/S0006-2952(01)00760-2.
- Sihn YS, Guillory JK, Kirsch LE. 1997. Quantitation of taurolidine decomposition in polymer solutions by chromotropic acid formaldehyde assay method . *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 16:643–650.
- Staubach KH. 1997. Adjuvante Peritonitistherapie mit Taurolidin Modulation der Mediatorfreisetzung . *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 382:S26. Doi:10.1007/PL00014640.

- Stendel R. 2006. Pro-apoptotische Therapie von Hirntumoren mit Taurolidin experimentelle und klinische Untersuchungen Freie Universität Berlin, Medizinische Fakultät Charité, Habilitationsschrift.
- Stitham J, Arehart EJ, Gleim SR, Douville KL, Hwa J. 2007. Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations . *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 82:95. Doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.05.010.
- Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE. 1991. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation . *Hypertension* 17:723–732.
- Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. 2001. Mitochondria: a target for myocardial protection . *Pharmacology & Therapeutics* 89:29. Doi:10.1016/S0163-7258(00)00102-9.
- Sun BS, Wang JH, Liu LL, Gong SL, Redmond HP. 2007. Taurolidine induces apoptosis of murine melanoma cells in vitro and in vivo by modulation of the Bcl-2 family proteins . *Journal of surgical oncology* 96:241. Doi:10.1002/jso.20827.
- Sutherland R, Croydon EA, Rolinson GN. 1970. Flucloxacillin, a new isoxazolyl penicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin . *British medical journal* 4:455–460.
- Suzuki H, Kawai S, Aizawa T, Kato K, Sunayama S, Okada R, Yamaguchi H. 1999. Histological evaluation of coronary plaque in patients with variant angina: relationship between vasospasm and neointimal hyperplasia in primary coronary lesions . *Journal of the American College of Cardiology* 33:198. Doi:10.1016/S0735-1097(98)00520-8.
- Szilagy DE, Smith RF, Elliott JP, Vrandecic MP. 1972. Infection in arterial reconstruction with synthetic grafts . *Annals of Surgery* 176:321. Pmid:4262892; doi:10.1097/0000658-197209000-00008.
- Tabaku M, Jashari R, Carton HF, Du Verger A, Van Hoeck B, Vanderkelen A. 2004. Processing of cardiovascular allografts: effectiveness of European Homograft Bank (EHB) antimicrobial treatment (cool decontamination protocol with low concentration of antibiotics) . *Cell and Tissue Banking* 5:261–266.
- Taher F, Assadian O, Falkensammer J, Senekowitsch C, Assadian A. 2016. Alloplastische Prothesen bei Protheseninfektionen . *Gefäßchirurgie* 21:145–150.
- Torres-Viera C, Thauvin-Eliopoulos C, Souli M, DeGirolami P, Farris MG, Wennersten CB, Sofia RD, Eliopoulos GM. 2000. Activities of taurolidine in vitro and in experimental enterococcal endocarditis . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1720–1724.
- Usuki K, Saras J, Waltenberger J, Miyazono K, Pierce G, Thomason A, Heldin CH. 1992. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity . *Biochemical and biophysical research communications* 184:1311. Doi:10.1016/S0006-291X(05)80025-7.
- Van den Bossche HV, Marichal P, Odds FC. 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi . *Trends in microbiology* 2:393. Doi:10.1016/0966-842X(94)90618-1.
- Van Langevelde P, van Dissel JT, Meurs CJ, Renz J, Groeneveld PH. 1997. Combination of flucloxacillin

- and gentamicin inhibits toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* in both logarithmic and stationary phases of growth . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:1682–1685.
- Vanhoutte PM. 2016. Regenerated endothelium and its senescent response to aggregating platelets . *Circulation Journal* 80:783–790.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. 2015. Endothelial dysfunction and vascular disease - a thirtieth anniversary update . *Acta Physiologica* Doi:10.1111/apha.12646.
- Veres G, Hegedüs P, Barnucz E, Schmidt H, Radovits T, Zöller R, Karck M, Szabó G. 2016. TiProtec preserves endothelial function in a rat model . *Journal of Surgical Research* 200:346. Doi:10.1016/j.jss.2015.06.062.
- Vesalius A. 1543. *De vivorum sectione nonnulla* , chap. XIX. *De humani corporis fabrica liber VIII*. Basel, pp. 658–661.
- Voorhees ABJ. 1985. The development of arterial prostheses. A personal view . *Arch Surg* 120:289–295.
- Wagner F. 2000. Opportunistische Pilzinfektionen: Diagnostik und Therapie . *Zeitschrift für Herz-, Thorax-und Gefäßchirurgie* 14:131–133.
- Waldman SA, Murad F. 1988. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system . *Journal of cardiovascular pharmacology* 12:115. Doi:10.1097/00005344-198800125-00020.
- Walters DK, Muff R, Langsam B, Gruber P, Born W, Fuchs B. 2007. Taurolidine: a novel anti-neoplastic agent induces apoptosis of osteosarcoma cell lines . *Investigational new drugs* 25:305. Doi:10.1007/s10637-007-9052-9.
- Weinstein MJ, Wagman GH, Oden EM, Marquez JA. 1967. Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin complex . *Journal of Bacteriology* 94:789–790.
- Welsch U. 2009. *Lehrbuch Histologie / Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, Kapitel 5.1, S.235-243* . 2. ed. Elsevier Urban & Fischer, München.
- White GW, Malow JB, Zimelis VM, Pahlavanzadeh H, Panwalker AP, Jackson GG. 1979. Comparative in vitro activity of azlocillin, ampicillin, mezlocillin, piperacillin, and ticarcillin, alone and in combination with an aminoglycoside . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15:540–543.
- Wiegand C, Abel M, Kramer A, Müller G, Ruth P, Hipler UC. 2007. Proliferationsförderung und Biokompatibilität von Polihexanid . *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2.
- Wilbring M, Tugtekin SM, Zatschler B, Ebner A, Reichenspurner H, Kappert U, Matschke K, Deußen A. 2013. Preservation of endothelial vascular function of saphenous vein grafts after long-time storage with a recently developed potassium-chloride and N-acetylhistidine enriched storage solution . *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 61:656–662.
- Wilbring M, Tugtekin SM, Zatschler B, Ebner A, Reichenspurner H, Matschke K, Deußen A. 2011. Even short-time storage in physiological saline solution impairs endothelial vascular function of saphenous

vein grafts . *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 40:811–815.

Wille T. 2010. Optimierung der kalten Lagerung von Blutgefäßen . Universität Duisburg-Essen, Universitätsklinikum Essen, Medizinische Fakultät, Institut für Physiologische Chemie, Dissertation .

Wille T, de Groot H, Rauen U. 2008. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments . *Journal of Vascular Surgery* 47:422. Doi:10.1016/j.jvs.2007.09.048.

Wille T, Rauen U. 2010. Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen . *Gefäßchirurgie* 15:442. Doi:10.1007/s00772-010-0845-3.

Yoo SY, Kim JY. 2009. Recent insights into the mechanisms of vasospastic angina . *Korean circulation journal* 39:505–511.

Zatschler B, Dieterich P, Müller B, Kasper M, Rauen U, Deußen A. 2009. Improved vessel preservation after 4 days of cold storage: experimental study in rat arteries . *Journal of Vascular Surgery* 50:397. Doi:10.1016/j.jvs.2009.04.064.

Zilla P, Oppell U, Deutsch U. 1993. The endothelium: a key to the future . *Journal of cardiac surgery* 8:32. Doi:10.1111/j.1540-8191.1993.tb00574.x.

Zschüttig A, Zimmermann K, Blom J, Goesmann A, Pöhlmann C, Gunzer F. 2012. Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLoS ONE*. 7:e33351. [Aktualisiert am: 30.03.2012, Aufruf am: 28.11.2017] URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033351>.

A Allgemeine Angaben

A.1 Erklärung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

Anlage 1

**Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011**

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med. A. Deußen, Frau B. Zatschler, Herrn Dr. rer. nat. P. Dieterich, Frau Dr. rer. nat. habil. A. Ebner, Frau Dipl.-Math. U. Range, Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Oertel, Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. M. Bachem und Herrn OA Dr. med. G. Steinbach und Herrn PD Dr. rer. nat. et rer. medic. habil. L. Jatzwauk
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht veröffentlicht.
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Ort, Datum

Unterschrift des Doktoranden

A.2 Erklärung über die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben

Anlage 2

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: EK 307-12-2007
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung (nicht zutreffend)
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes Projektnummer (nicht zutreffend)
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Ort, Datum

Unterschrift des Doktoranden

A.3 Lebenslauf

Schuldbildung

09/1994 - 07/1998 Grundschule Friedrich-Freudenthal-Schule Fintel
09/1998 - 07/2007 Orientierungsstufe Beekeschule Scheeßel
08/2000 - 07/2007 Privatgymnasium Eichenschule Scheeßel,
Abschluss: Abitur (2,9)

Studium

10/2007 - 09/2008 **Georg-August-Universität Göttingen**
Studium: Agrarwissenschaften (B.Sc.)
10/2008 - 03/2009 **Universität Hamburg**
Studium: Geowissenschaften (B.Sc.)
04/2009 - 03/2016 **Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus**
der Technischen Universität Dresden
Studium: Humanmedizin
Seit 03/2012 **Dissertation** bei Prof. Dr. med. A. Deußen, Institut für Physiologie
Thema: Untersuchungen zur Gefäßfunktion nach Kaltlagerung von
 humanen A. mammaria interna in Kombination mit
 antimikrobieller Dekontamination
Zusatz: Assoziationsmitglied der **Else-Kröner-Fresenius-Stiftung**
 seit 10/2012

Berufliche Tätigkeit

Seit 07/2016 **Ärztin in Weiterbildung für Innere Medizin**
 Städtisches Klinikum Braunschweig

Praktika

07/2005, 08/2008, Praktikum Apotheke, Fintel
01/2009
08/2006 - 08/2006 Praktikum Pädiatrie, Eberswalde,
 Dipl.- Med. S. Lucke, Fachärztin für Pädiatrie
07/2007 - 08/2007 Praktikum Orthopädie, Soltau,
 Dr. med. S. Wahl, Facharzt für Orthopädie/Chirotherapie
08/2007 - 09/2007 Praktikum Allgemeinmedizin, Fintel,
 Dr. med. J. Vogel, Fachärztin für Allgemeinmedizin
05/2008 Ausbildung erster Hilfe, Rotenburg (Wümme)

A.3 Lebenslauf

02/2009 - 04/2009, 08/2009 - 09/2009	Pflegepraktikum Kreiskrankenhaus Prignitz, Station Innere Medizin
07/2011 - 08/2011	Famulatur Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden, Station für Viszeralchirurgie
02/2012 - 03/2012	Famulatur Herzzentrum Universitätsklinikum Dresden, Station für Herzchirurgie
07/2012 - 08/2012	Famulatur Gemeinschaftspraxis für Innere Medizin in Hannover Dr. med. A. Buck und Dr. med. U. Leugner
02/2013 - 03/2013	Famulatur DRK Krankenhaus Clementinenhaus Hannover, Station für Innere Medizin
11/2014 - 03/2015	PJ Allgemeinmedizin, Carus Hausarztpraxis, Prof. Dr. med. A. Bergmann
03/2015 - 06/2015	PJ Rotation zwischen den chirurgischen Fachbereichen des Klinikum Dresden Friedrichstadt (VTG, UWC, Handchirurgie, Gefäßchirurgie)
06/2015 - 10/2015	PJ Innere Medizin, Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden

Studienbegleitende Tätigkeiten

11/2009 - 12/2009	"Embryoprojekt" Institut für Anatomie, Prof. Dr. A. May
01/2011	Recherche "Famulatur im Ausland", Prof. Dr. med. A. Deußen
08/2011 - 10/2011	Datenbankrecherche Forschungsgruppe HNPCC/FAP Medizinisches Versorgungszentrum, Prof. Dr. H. Schackert
06/2012	Tutor Physiologie Praktika im Institut für Physiologie Dresden
10/2013 - 10/2014	Mentoring-Programm der TU-Dresden <u>Mentor:</u> CA Dr. med. M. Freitag , CA der Chirurgie, Krankenhaus St. Joseph Stift Dresden

Sprachkenntnisse

Englisch	5. bis 11. Klasse
Latein	7. bis 10. Klasse, Abschluss: kleines Latinum
Spanisch	9. bis 13. Klasse, Abschluss: Diploma Español Nivel Inicial

A.4 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden angefertigt.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Deußen, Leiter des Instituts für Physiologie bedanken. Ich hatte die Möglichkeit meine Dissertation unter seiner wissenschaftlichen Leitung durchzuführen. Des Weiteren gilt mein Dank für seine freundliche Betreuung und sein unermüdliches Engagement mich zu unterstützen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Klaus Matschke, Direktor der Klinik für Herzchirurgie des Herzzentrums Dresden, für die freundliche Bereitstellung der A. mammaria interna-Segmente. Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team der Klinik für Herzchirurgie für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Physiologie für die kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken. Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Birgit Zatschler für die große Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat bei der Arbeit mit dem Myographen und bei der Beantwortung zahlreicher Fragen zur Seite.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. habil. Annette Ebner für ihre Unterstützung, ihre Kritik und ihre stetige Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Dipl.-Math. Ursula Range und Herrn Dr. rer. nat. Peter Dieterich für die Hilfe bei der statistischen Analyse und Auswertung meiner Daten bedanken. Ebenfalls gilt mein großer Dank Frau Ursula Raabe für ihre Unterstützung bei der Klärung organisatorischer Fragen und die tolle Begleitung während meiner Zeit als Doktorandin. Ich möchte mich auch bei Herrn Dr. Ing. Volker Zürich für die stetige Bereitstellung von SPSS bedanken.

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. et rer. medic. habil. Lutz Jatzwauk, Leiter für Krankenhaushygiene und Umweltschutz, Universitätsklinikum Dresden, für die Beantwortung zahlreicher Fragen. Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Oertel, Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Dresden sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Max Bachem und Herrn OA Dr. med. Gerald Steinbach, Institut für klinische Chemie, Universitätsklinikum Ulm, für die Stabilitätsmessungen einzelner antimikrobieller Dekontaminationsstoffe für meine Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Vorgängerin Frau Dr. med. Stephanie Garbe für die Beantwortung meiner vielen Fragen und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für ihre fortwährende Unterstützung und das große Verständnis bedanken. Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Daniel Giesecke, der mir immer wieder Kraft gegeben und mich motiviert hat sowie für seine unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

B Weiterführende Tabellen und Abbildungen

B.1 Diagramme aus Abschnitt 4.1.3 Stabilitätsmessungen der Kontraktionsplateaus von NA

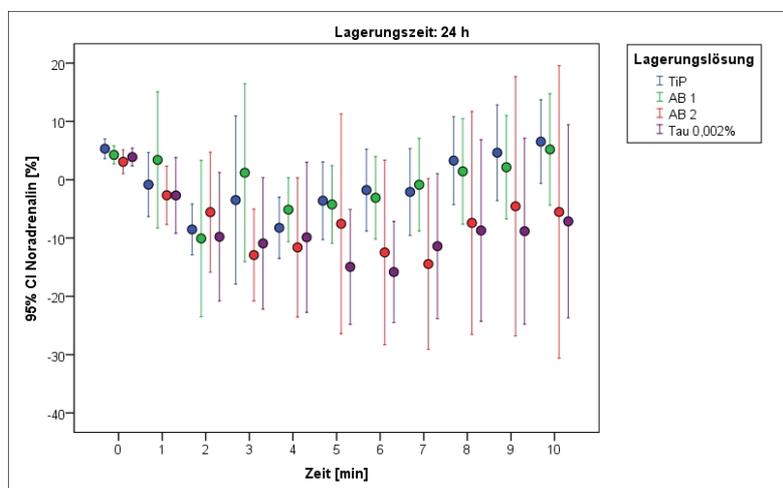


Abb. B.1: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden

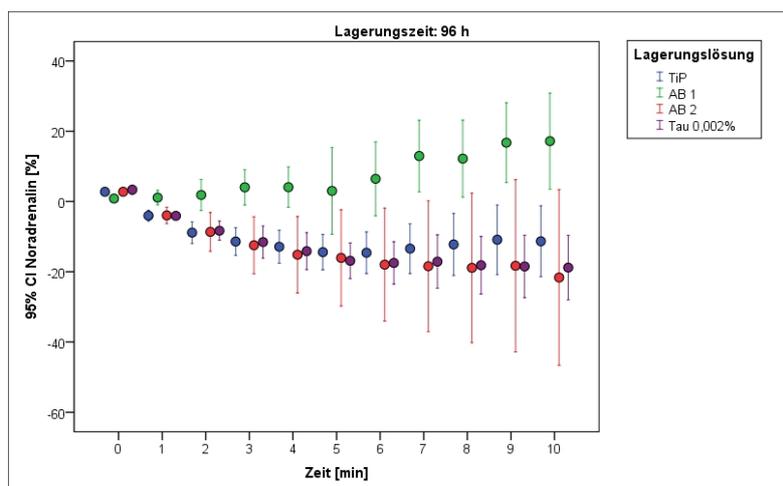


Abb. B.2: Tonusveränderung unter Noradrenalin über 10 Minuten nach einer Lagerungsdauer von 96 Stunden

B.2 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.3 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch ACh-Stimulation

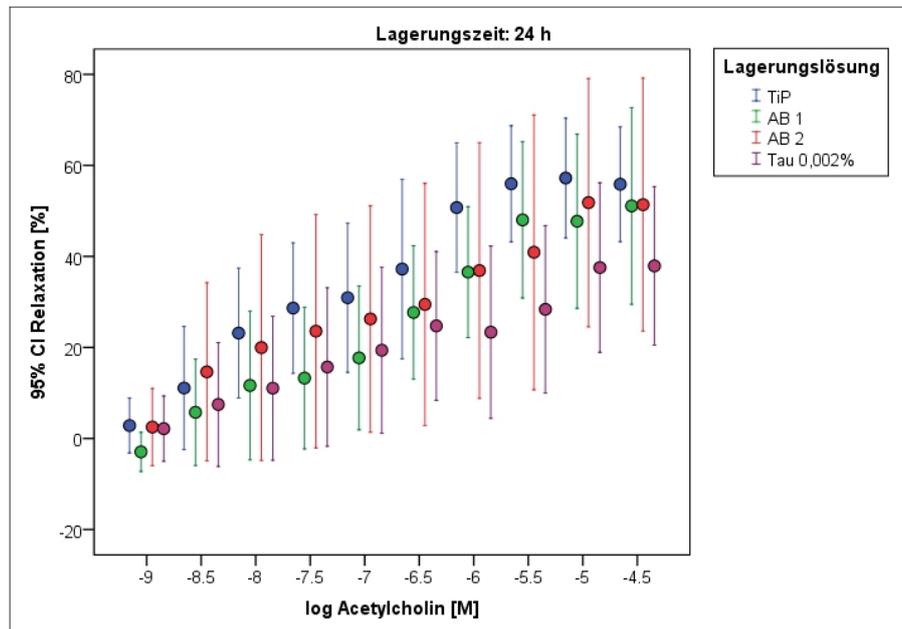


Abb. B.3: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. B.1: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
24h	TiP	62,74	6,02	-6,37	0,94	1,19	0,47
24h	AB1	55,06	8,89	-5,12	1,18	1,64	0,56
24h	AB2	55,27	11,93	-7,52	9,46	4,30	2,23
24h	Tau 0,002%	49,61	9,12	-3,97	4,30	3,21	1,41

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

B.2 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.3 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch ACh-Stimulation

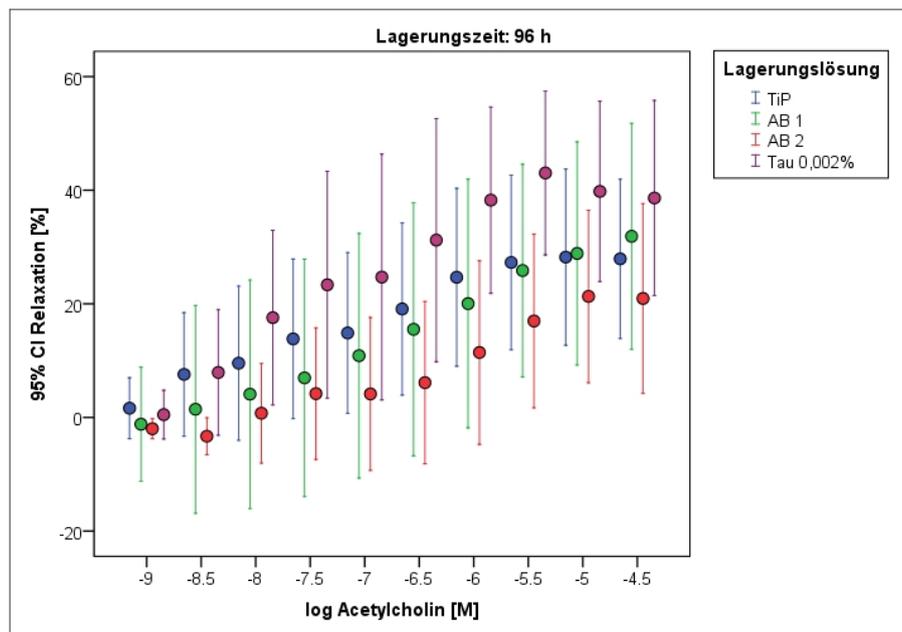


Abb. B.4: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der ACh-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. B.2: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
96h	TiP	34,30	7,35	-4,14	5,45	3,32	1,70
96h	AB1	32,01	9,26	-7,63	10,77	3,35	2,28
96h	AB2	26,08	7,87	-3,57	1,61	1,09	0,54
96h	Tau 0,002%	54,30	8,97	-5,00	2,48	2,47	1,39

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

B.3 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.4 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch SNP-Stimulation

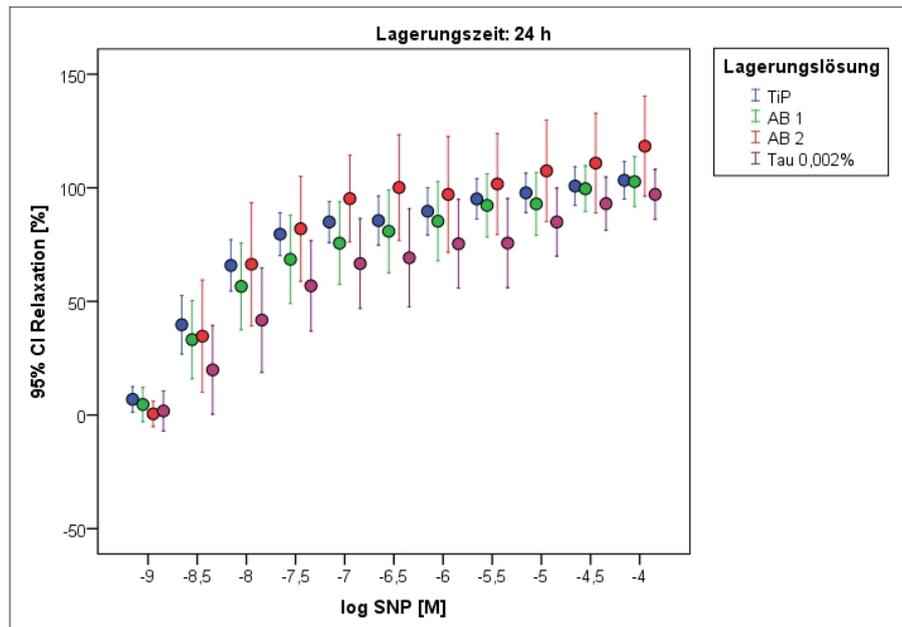


Abb. B.5: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. B.3: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
24h	TiP	103,31	3,98	-8,27	0,07	0,42	0,08
24h	AB1	103,73	4,33	-8,02	0,24	0,71	0,26
24h	AB2	118,82	9,90	-8,14	0,15	0,45	0,16
24h	Tau 0,002%	97,09	4,93	-7,73	0,36	0,75	0,34

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

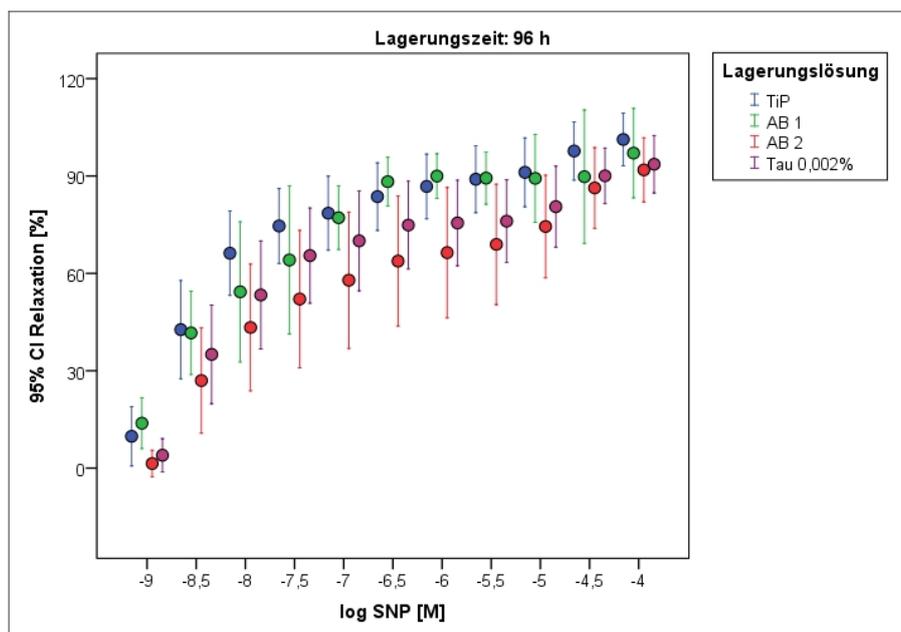


Abb. B.6: Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei stufenweise Erhöhung der SNP-Konzentration nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden in den unterschiedlichen Lösungen.

Tab. B.4: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für SNP Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Zeit	Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
96h	TiP	102,42	3,78	-8,36	0,10	0,47	0,10
96h	AB1	102,42	3,71	-8,20	0,17	0,73	0,19
96h	AB2	93,14	4,70	-7,45	0,63	1,10	0,49
96h	Tau 0,002%	94,08	4,04	-8,25	0,21	0,61	0,26

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

B.4 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.6 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach ACh-Stimulation der Inhibitorgruppen 2 und 3

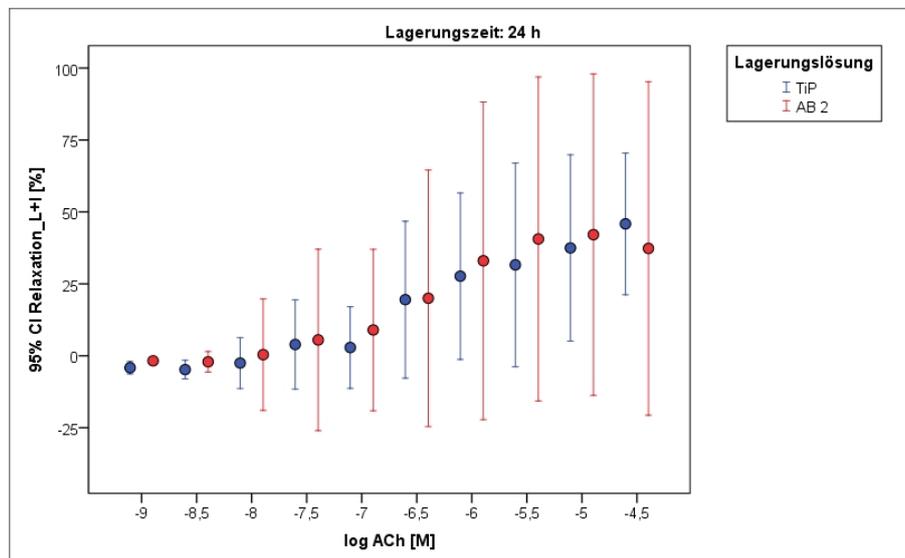


Abb. B.7: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

Tab. B.5: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	46,49	9,38	-5,04	1,04	0,99	0,44
AB2	43,92	19,41	-5,46	5,38	2,22	1,81

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

B.4 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.6 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach ACh-Stimulation der Inhibitorgruppen 2 und 3

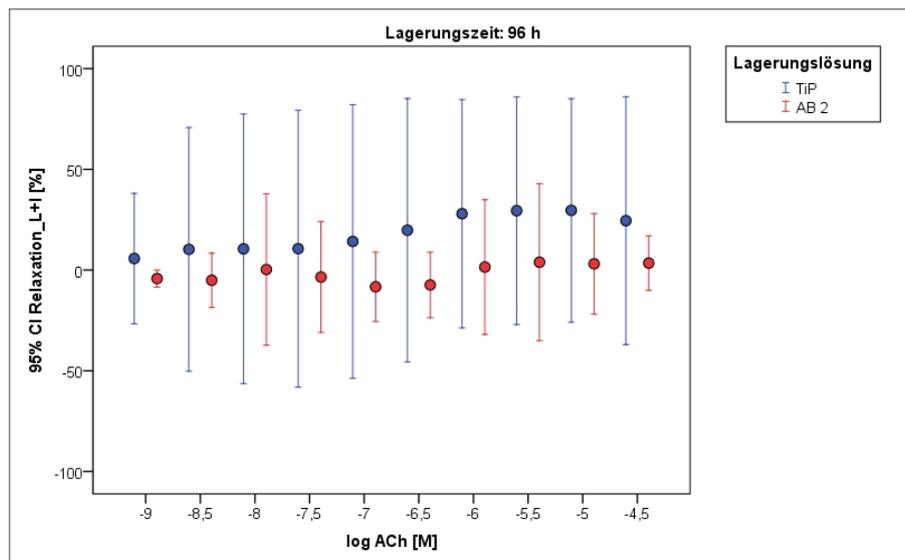


Abb. B.8: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

Tab. B.6: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	32,06	16,97	-17,74	14,93	5,32	2,66
AB2	9,77	10,20	-11,64	13,93	3,14	2,97

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

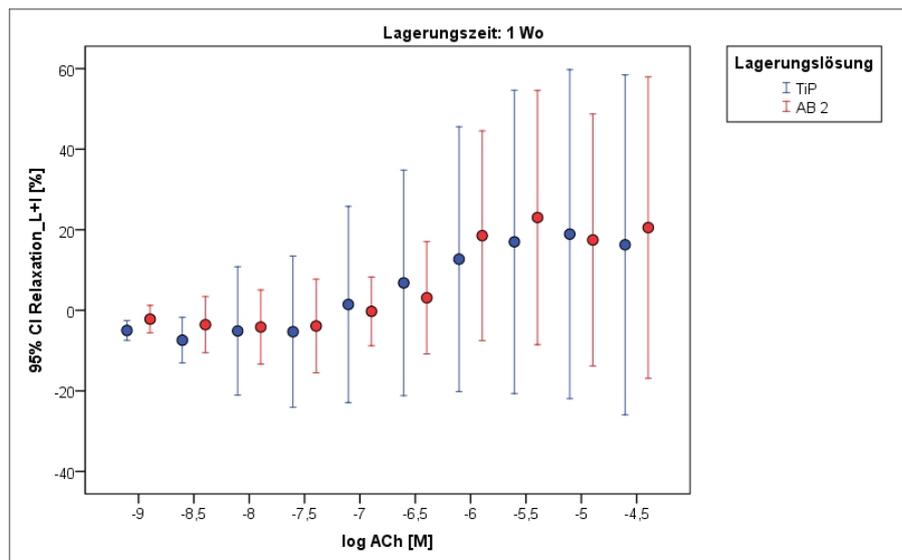


Abb. B.9: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 2 von ACh nach einer Lagerungszeit von 1 Woche

Tab. B.7: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	21,99	14,82	-9,26	12,07	3,20	2,57
AB2	23,54	10,22	-4,92	2,71	1,03	0,98

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 2 nach einer Lagerungszeit von 1 Wochen

Tab. B.8: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 24 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	5,50	1,51	-1,75	1,37	1,39	0,36
AB2	8,67	2,09	-2,98	3,44	1,89	0,96

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

B.4 Diagramme und Tabellen aus Abschnitt 4.2.6 Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach ACh-Stimulation der Inhibitorgruppen 2 und 3

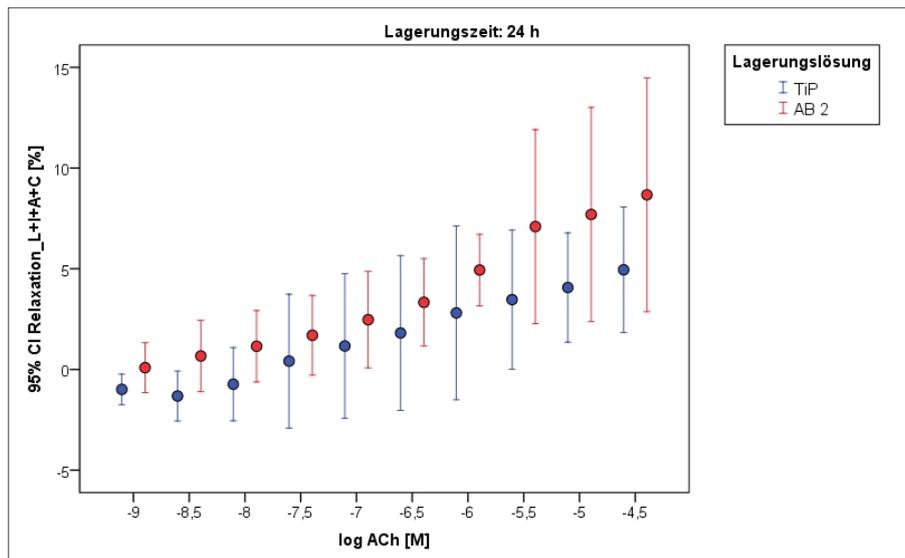


Abb. B.10: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden

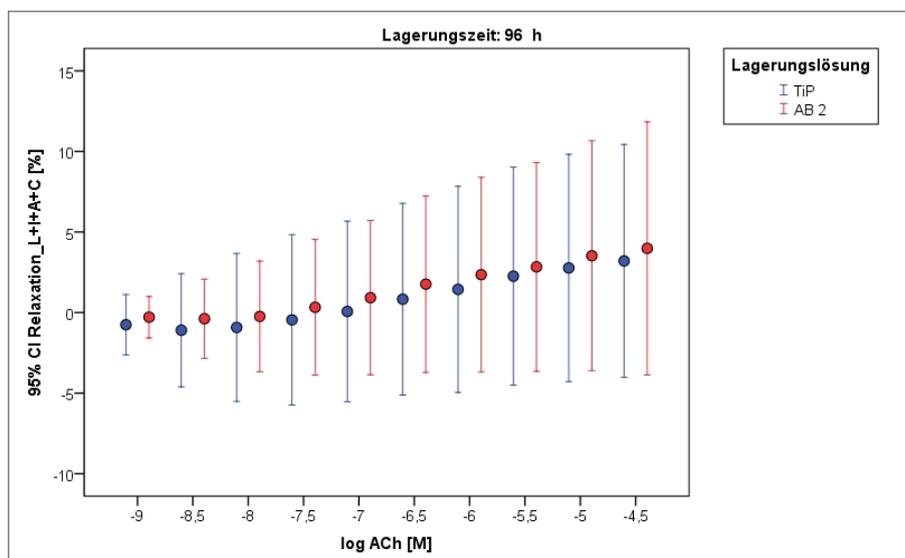


Abb. B.11: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

Tab. B.9: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 96 Stunden Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	3,39	2,21	-5,57	9,85	2,15	2,20
AB2	4,50	1,96	-3,88	7,66	2,23	1,77

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 96 Stunden

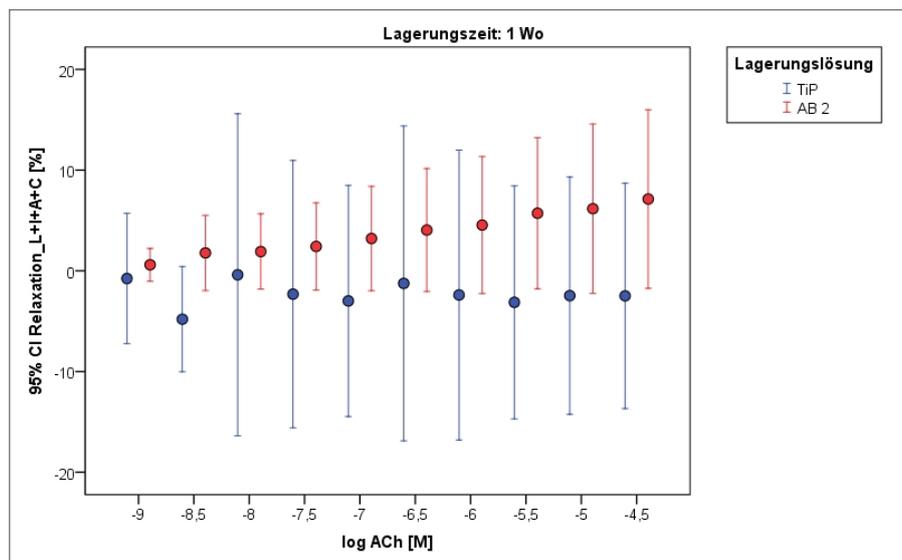


Abb. B.12: Konzentrationswirkungskurven der Inhibitorgruppe 3 von ACh nach einer Lagerungszeit von 1 Woche

Tab. B.10: R_{max} -, EC_{50} - und ΔR -Werten für ACh Stimulation nach 1 Woche Lagerung in unterschiedlichen Lösungen

Lösung	R_{max} [%]	SEM- R_{max}	$-\log EC_{50}$ [M]	SEM- EC_{50}	ΔR	SEM- ΔR
TiP	3,42	4,95	10,10	13,68	2,60	2,98
AB2	7,13	2,79	3,14	4,59	2,65	1,41

Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern (SEM) der Inhibitorgruppe 3 nach einer Lagerungszeit von 1 Woche

B.5 Colorimetrische Bestimmung von Taurolidin-Metaboliten

Bedingungen:

50 μl Probe + 200 μl NASH-Reagenz; Inkubationszeit = 30 min 60 °C bei 120 min Raumtemperatur;
Absorptionsmessung bei 414 nm; Korrekturwellenlänge 500 nm

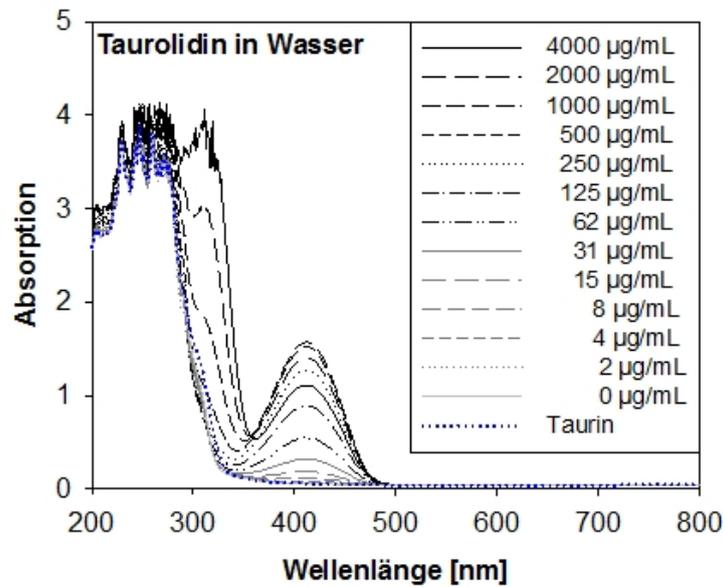


Abb. B.13: Taurolidin in Aqua dest. zum Zeitpunkt 0 h

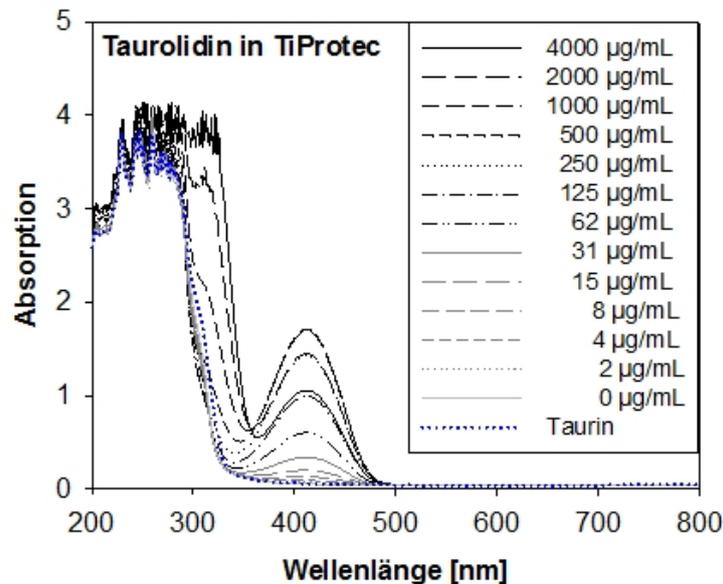


Abb. B.14: Taurolidin in TiProtec® zum Zeitpunkt 0 h

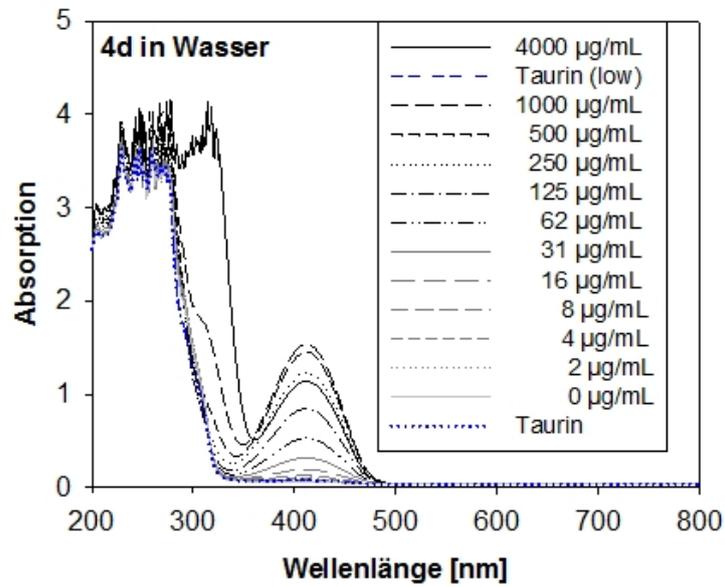


Abb. B.15: Taurolidin in Aqua dest. nach 4 Tagen Lagerungszeit

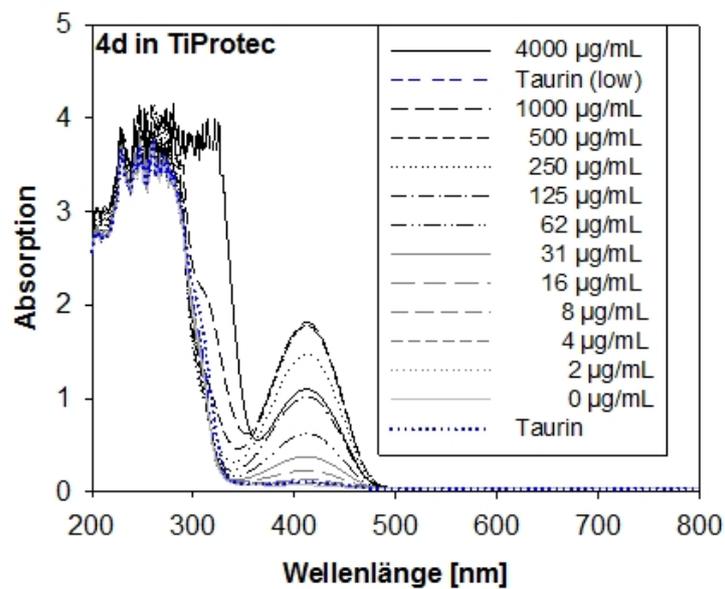


Abb. B.16: Taurolidin in TiProtec® nach 4 Tagen Lagerungszeit

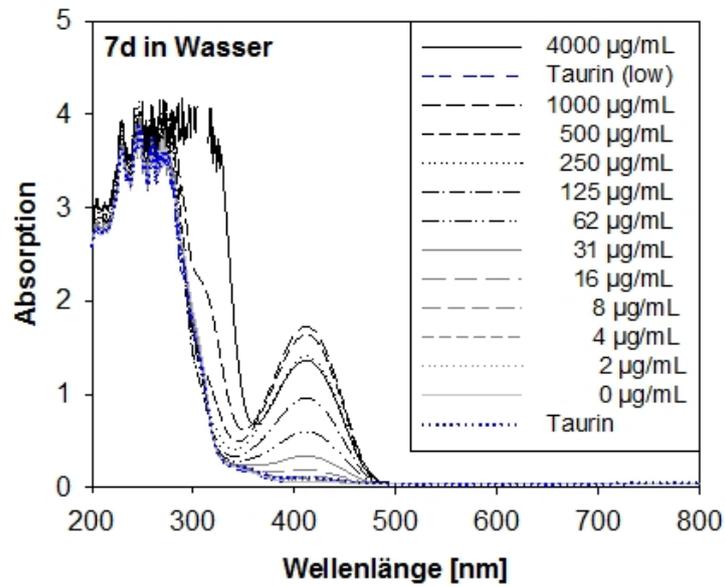


Abb. B.17: Taurolidin in Aqua dest. nach 7 Tagen Lagerungszeit

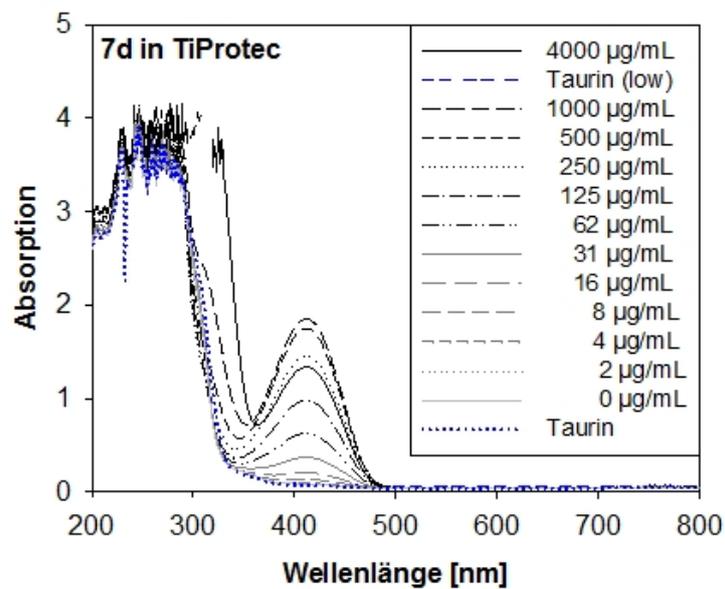


Abb. B.18: Taurolidin in TiProtec® nach 7 Tagen Lagerungszeit