

Gefäßchirurgie

Zeitschrift für vaskuläre und endovaskuläre Medizin

Elektronischer Sonderdruck für U. Rauen

Ein Service von Springer Medizin

Gefäßchirurgie 2010 · 15:442–447 · DOI 10.1007/s00772-010-0845-3

© Springer-Verlag 2010

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

T. Wille · U. Rauen

Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen

Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen

Gefäßtransplantate werden, wie viele biologische Materialien, bevorzugt kalt gelagert. Je nach erforderlicher Lagerungszeit werden hierfür meist „physiologische“ Salzlösungen oder aus der Transplantationsmedizin übernommene Organprotektionslösungen verwendet. Zellbiologische Untersuchungen deckten jedoch kürzlich neue Mechanismen der Lagerungsschädigung auf, gegen die diese Lösungen keinerlei Schutz bieten. Hier wurde daher die Relevanz dieser neuen Schädigungsmechanismen für die Lagerung isolierter Gefäße untersucht und darauf basierend eine neue Lösung zur Gefäßprotektion entwickelt.

Gefäßhomo- und -allografts werden als Rekonstruktionsmaterial in der Gefäß-

chirurgie [10], bei kardiovaskulären Eingriffen, in der Bypasschirurgie [29] sowie in der Transplantationschirurgie [4] eingesetzt.

Hierzu werden in der kardiovaskulären Chirurgie freie Gefäßgrafts kurze Zeit zwischen 4°C und Raumtemperatur in heparinisiertem Blut, physiologischer Kochsalzlösung oder Organkonservierungslösungen gelagert [29]. Für den Einsatz in der Transplantationschirurgie, bei postoperativen Gefäßkomplikationen oder infizierten Gefäßprothesen und insbesondere zur Vorhaltung in Gewebebanken werden Gefäße über längere Zeitspannen (zum Teil für mehrere Wochen) gelagert, meist in Organprotektionslösungen, die aus der Transplantationschirurgie stammen [5].

Kaltlagerung: Schutz vs. Schädigung

Hypothermie (0–4°C) wird weit verbreitet für die Lagerung von Zellen, Geweben und Organen eingesetzt, um den Metabolismus und durch Sauerstoff- und Substratmangel induzierte Schädigungsprozesse zu verlangsamen. So werden auch Gefäße, insbesondere wenn es sich um eine längere Lagerungszeit handelt, bei Kälte gelagert. Doch Kälte schützt nicht nur vor der Schädigung durch Sauerstoff- und Substratmangel, sondern verursacht auch selbst eine Schädigung [1, 2, 16, 17, 22, 24]. Der schädigende Effekt der Hypothermie wurde in den Anfängen der Transplantationsmedizin der kälteinduzierten Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase mit nachfolgender Erhöhung des intrazellulären Na⁺-Gehalts zugeschrieben. Dadurch sollte es zu einem passiven Influx von Chloridionen und Wasser mit konsekutiver Entwicklung eines zellulären Ödems kommen, das letztendlich zu einer Nekrose führen soll [1, 2].

Entsprechend dem damaligen Verständnis der hypoxischen Schädigung und dieser klassischen Hypothese zur Kälteschädigung wurden vor mehreren Dekaden Organkonservierungslösungen wie die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK), die University-of-Wisconsin-Lösung (UW) oder die Perfadex-Lösung entwickelt, die den Veränderungen der zellulären Ionenhomöosta-

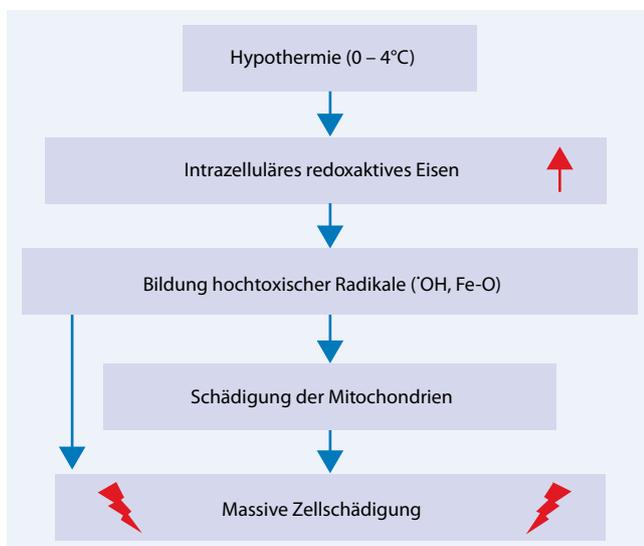


Abb. 1 Mechanismus der kälteinduzierten eisenabhängigen Schädigung. Verschiedene Zelltypen, u. a. auch Endothelzellen, erleiden eine starke Schädigung, wenn sie Kälte ausgesetzt sind. Details s. Text

Dr. Timo Wille wurde für diese Arbeit mit dem Julius-Springer-Preis für Gefäßmedizin 2010 ausgezeichnet.

se entgegenwirken sollen. In neueren Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass verschiedene kultivierte Zelltypen transplantationsrelevanter Gewebe, wie Hepatozyten und Endothelzellen, keinen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration während der Kaltinkubation zeigen [7, 17]. Trotzdem erleiden diese Zellen eine starke kälteinduzierte Schädigung, gegen die keine der derzeit klinisch verwendeten Konservierungslösungen Schutz bietet.

Mechanismen der kälteinduzierten Schädigung kultivierter Endothelzellen

Neue Untersuchungen zeigten, dass die kälteinduzierte Schädigung etlicher kultivierter Zelltypen über eine eisenabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt wird [16, 17, 21, 22, 24]. Die von der Dauer der Kaltlagerung abhängige Schädigung erfolgt während der Kaltlagerung unter uncharakteristischer oder nekrotischer Morphologie. Während der Wiedererwärmung kommt es zu einer Verstärkung der Schädigung unter apoptotischer Morphologie [17, 22]. Besonders sensitiv für diese Schädigung sind Endothelzellen [17, 21, 22, 25].

Die kälteinduzierte Schädigung ist insbesondere vom chelatisierbaren, redoxaktiven Eisenpool abhängig [21]. Dabei handelt es sich um einen kleinen Teil der intrazellulären Eisenionen (0,2–3%), die durch niedermolekulare Komponenten wie ATP, Phosphat oder Citrat chelatisiert, oder locker an Proteine und Lipide assoziiert sind [21]. Dieser Eisenpool, der in der Kälte rasch ansteigt [21], überführt niedrig reaktive Sauerstoffspezies in hochreaktive Spezies (Hydroxylradikal, Eisen-Sauerstoff-Spezies), die dann zu einer massiven Zellschädigung führen (Abb. 1). Bei dieser eisenabhängigen, kälteinduzierten Schädigung stellen insbesondere die Mitochondrien ein empfindliches Ziel dar. Eisenabhängig kommt es zum mitochondrialen Permeabilitätsübergang, der Ausbildung einer mitochondrialen Pore, die dann zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials führt [17, 19]. Bei einigen Zellen, u. a. Leberendothelzellen, tritt zudem eine mitochondriale Ultrakondensation auf, die

ebenfalls eisenabhängig ist [8]. Sämtliche derzeit klinisch eingesetzten Konservierungslösungen schützen nicht nur nicht gegen diese Schädigung, sondern verstärken sie z. T. sogar [9, 18].

Eisenabhängige Schädigung von Endothelzellen im Gefäßmodell

Um abzuklären, in wie weit der oben dargestellte eisenabhängige Mechanismus auch in Endothelzellen im intakten Gefäß auftritt, wurde hier ein Schweineaortenmodell etabliert (Abb. 2). Nach Kaltlagerung in HTK-Lösung wurden die Schweineaortensegmente unmittelbar oder nach 3 Stunden Wiedererwärmung mit den DNA-interkalierenden Farbstoffen Propidiumjodid und Hoechst 33342 gefärbt. Das membranpermeable Hoechst 33342 markiert dabei die Kerne aller Zellen (grüne Fluoreszenz), während Propidiumjodid impermeabel für die Plasmamembran intakter Zellen ist und somit nur die Kerne nekrotischer und spätapoptotischer Zellen (rot; in der Überlagerung orange) fluoreszieren lässt. Anschließend konnte mit einem Intravitalfluoreszenzmikroskop der prozentuale Anteil der toten Endothelzellen (Propidiumjodidaufnahme) bestimmt werden.

Die kälteinduzierte Schädigung des Endothels *in situ* war von der Dauer der Kaltlagerungszeit abhängig (Abb. 3). Nach Wiedererwärmung stieg der Anteil der propidiumjodidpositiven Endothelzellen weiter an. Durch die Zugabe des Eisenchelators Deferoxamin (1 mM, Abb. 3) konnte die Schädigung deutlich reduziert werden, sodass der Mechanismus der eisenabhängigen kälteinduzierten Schädigung offenbar auch im intakten Gefäß gültig ist.

Entwicklung einer neuen Gefäßprotektionslösung

Sich anschließende Versuchsserien dienten der Optimierung der Basislösung [26, 27]. Ausgehend von der neuen, nach aktuellen mechanistischen Gesichtspunkten zusammengesetzten Organprotektionslösung Custodiol-N (Tab. 1, [28]) wurde versucht, die Lagerung von Gefäßen weiter zu verbessern. Für kleinere Gewebstücke ist die in der Organprotektion üb-

Zusammenfassung · Abstract

Gefäßchirurgie 2010 · 15:442–447
DOI 10.1007/s00772-010-0845-3
© Springer-Verlag 2010

T. Wille · U. Rauen

Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen

Zusammenfassung

Isolierte Endothelzellen zeigen bei Kaltlagerung eine prominente eisenabhängige Schädigung. Hier konnten wir zeigen, dass diese Schädigung auch bei Gefäßendothelzellen *in situ* auftritt und durch Einsatz von Eisenchelatoren deutlich reduziert werden kann. Eine zusätzliche Optimierung der Basislösung führte im Gefäßmodell zu einer weiteren deutlichen Verbesserung der Endothelzellvitalität nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung sowie zu einer Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials und einer Verminderung der Thrombozytenadhäsion im Vergleich zur Kaltlagerung in aktuell klinisch eingesetzten Lösungen. Weitere Studien zeigten zudem eine deutlich verbesserte Vasoreaktivität nach Kaltlagerung in der neuen Lösung. Die hier vorgestellte Gefäßprotektionslösung Ti Protec[®] erlaubt somit eine deutlich längere Lagerung von Gefäßen bei exzellentem Funktionserhalt.

Schlüsselwörter

Gefäßtransplantation · Kaltlagerung · Gefäßprotektionslösung · Endothel · Kälteinduzierte Zellschädigung

A new vascular preservation solution

Abstract

Isolated endothelial cells suffer a severe iron-dependent damage during cold storage. Here, we show that this injury also affects vascular endothelial cells *in situ* and that iron chelators are able to attenuate this damage. A further optimization of the base solution resulted in a considerable improvement of endothelial cell viability after cold storage and rewarming of isolated vessels, it allowed maintenance of the mitochondrial membrane potential and reduced platelet adhesion compared to solutions currently in clinical use. Further studies showed improved vasoreactivity after cold storage in the new solution. The vascular preservation solution Ti Protec[®] introduced here thus enables a substantial prolongation of vessel storage with excellent maintenance of vessel function.

Keywords

Vascular graft · Cold storage · Vascular preservation solution · Endothelium · Cold-induced cell damage

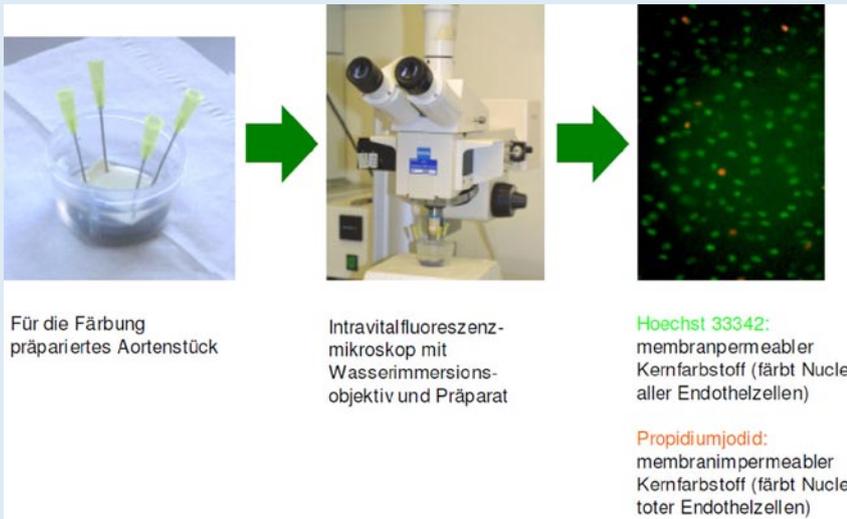


Abb. 2 ▲ Versuchsaufbau und Beispiel der Vitalitätsuntersuchungen

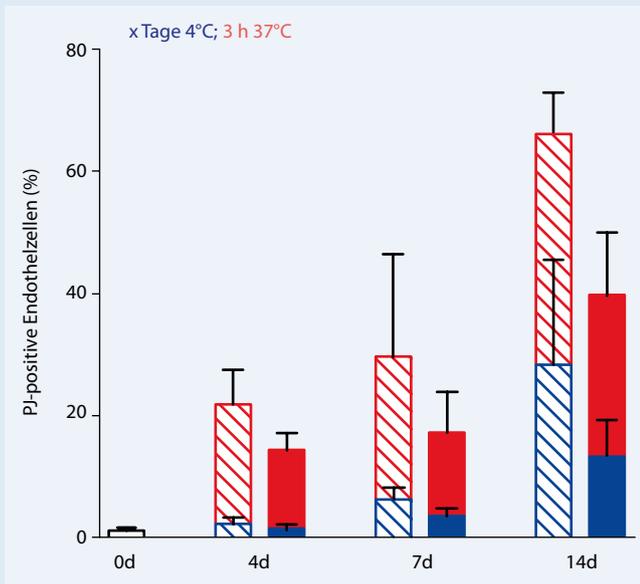


Abb. 3 ▲ Auftreten der kälteinduzierten Schädigung im Endothel von Schweineaorten. Schweineaortensegmente wurden für 4–14 Tage (d) bei 4°C in HTK-Lösung (schraffierte Balken) oder in HTK-Lösung supplementiert mit 1 mM Deferoxamin (ausgefüllte Balken) gelagert und danach unmittelbar mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt (blaue Balken) oder für 3 Stunden wiedererwärmt und dann mit Propidiumjodid gefärbt (rote Balken). Gefäßsegmente 0 d (Kontrolle) wurden nicht kalt gelagert, aber analog zum Wiedererwärmungsprozedere für 3 Stunden bei 37°C gelagert. (Aus [27], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

liche hohe Pufferkapazität nicht erforderlich und wurde daher gesenkt. Wurde die entstehende osmotische Lücke durch Ionen aufgefüllt (ionenreiche Lösung), zeigten sich im oben genannten Schweineaortenmodell bessere Ergebnisse als bei Auffüllung durch Saccharose (ionenarme Lösung) [27]. Als Hauptanion war Chlorid dem impermeablen Laktobionat dabei

deutlich überlegen [26, 27]. Wurde Kalium als Hauptkation eingesetzt, trat eine signifikant geringere Endothelzellschädigung auf als mit Natrium als Hauptkation [27]. Bezüglich des pH-Wertes zeigte ein pH von 7,0 eine bessere Protektion als ein pH von 7,4. Abschließend wurde zusätzlich zu dem starken, aber hydrophilen Eisenchelator Deferoxamin der neue lipo-

phile Eisenchelator LK 614 [28] eingesetzt, der bereits in sehr geringen Konzentrationen von 20 und 50 µM hoch effektiv war und in Kombination mit 0,1 mM Deferoxamin die Schädigung des Gefäßendothels weiter signifikant senken konnte [26, 27].

Vergleich der besten Lösung mit derzeit klinisch eingesetzten Lösungen

Im Vergleich zu den derzeit klinisch eingesetzten Lösungen zeigte die neue Lösung eine deutlich geringere Endothelzellschädigung (Abb. 4). Als zusätzlicher, funktioneller Parameter wurde das mitochondriale Membranpotential der Gefäßendothelzellen *in situ* untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Vorteil durch die neue Lösung (Abb. 5, [27]). Des Weiteren wurde im oben genannten Modell die Adhäsion fluoreszenzmarkierter Thrombozyten an das Gefäßendothel bestimmt. Die Thrombozyten-Anhefte rate (als Marker für die Thrombogenität) betrug nach Lagerung der Schweineaortensegmente in der neuen modifizierten Lösung nur ein Viertel des Wertes der in HTK-Lösung gelagerten Segmente und sogar eine tendenziell niedrigere Thrombozytenadhäsion als in Perfadex-Lösung gelagerte Gefäße (Perfadex-Lösung hemmt aufgrund des darin enthaltenen Dextrans die Thrombozytenadhäsion wahrscheinlich direkt [23]).

Diskussion der Hauptkomponenten/ Wirkprinzipien der Lösung

Eisenchelatoren

Im oben beschriebenen Gefäßmodell wurde eine von der Kaltlagerungszeit abhängige, eisenabhängige und sich bei Wiedererwärmung verstärkende Endothelzellschädigung gefunden (Abb. 3), sodass der Mechanismus der eisenabhängigen kälteinduzierten Schädigung offenbar auch im intakten Gefäß gültig ist [26, 27]. Diese eisenabhängige Schädigung konnte inzwischen auch in weiteren Gefäßmodellen nachgewiesen werden [25, 30]. Der hier zusätzlich zum hydrophilen Deferoxamin eingesetzte neue Eisenchelator LK 614 zeigte eine sehr gute Protektion. Aufgrund

seiner Lipophilie permeiert er schnell die Zellmembran und kann so intrazelluläres Eisen, insbesondere in der frühen Phase der Kaltlagerung, chelatisieren.

Chlorid

Im direkten Vergleich der Anionen Chlorid und Laktobionat zeigte sich ein protektiver Effekt durch eine hohe Chloridkonzentration für die Lagerung von Gefäßendothelzellen [26, 27]. Dies ist bemerkenswert, da kultivierte Hepatozyten [18] und Pankreasinzellen (S. Straube, U. Rauen, 2008, unveröffentlichte Ergebnisse) durch hohe Chloridkonzentrationen bei Kaltlagerung geschädigt werden, und weist auf zelltypspezifische Unterschiede hin. Chloridkanäle der Plasmamembran spielen in diversen Modellen der Apoptose eine Rolle [11]; der genaue molekulare Mechanismus der Protektion durch eine hohe extrazelluläre Chloridkonzentration bei Endothelzellen ist bisher jedoch noch unklar. Der klassischen Hypothese der Kälteschädigung, gemäß der Chlorid schädlich sein soll [1], widersprechen diese Befunde jedoch eindeutig.

Kalium

Der Befund, dass eine kaliumreiche Lösung das Endothelzellüberleben verbessert, ist überraschend. In der überwiegenden Zahl der Publikationen wird Kalium als endotheltoxisch beschrieben [12, 15]. Allerdings wurden in den entsprechenden Lagerungsstudien zum Teil komplexe Konservierungslösungen mit unterschiedlichem pH-Wert, unterschiedlicher Osmolarität und/oder Ionenzusammensetzung und Osmolyten verglichen, sodass nicht klar zwischen dem Effekt von Kalium und dem anderer schädigender Mechanismen unterschieden werden konnte, teils wurden die Studien am Gesamtorgan und nicht an isolierten Gefäßen durchgeführt. Zatschler et al. [30] konnten in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei Versuchen zur Vasoreaktivität kalt gelagerter Mesenterialarterien ebenfalls einen Vorteil einer kaliumreichen im Vergleich zu einer natriumreichen Konservierungslösung zeigen. Möglicherweise verhindert eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration während der

Kaltlagerung einen Kaliumausstrom aus den Gefäßendothelzellen [3] und so die Einleitung der Apoptose [11].

pH-Wert

Der pH-Wert von Custodioli-N wurde auf 7,0 eingestellt, da eine leichte Azidose gegen mehrere Mechanismen der Zellschädigung protektiv ist [14]. Die Befunde mit der auf der Basis von Custodioli-N entwickelten Gefäßprotektionslösung zeigten, dass sowohl die Vitalität, als auch das mitochondriale Membranpotential bei pH 7,0 im Vergleich zu pH 7,4 signifikant besser erhalten waren [26, 27].

N-Acetylhistidin

N-Acetylhistidin wurde bereits in Custodioli-N als Puffer eingesetzt, da es bei vergleichbarer Pufferkapazität im Gegensatz zu Histidin keine Toxizität aufweist [20].

Glukose

Glukose wurde der Gefäßprotektionslösung als Substrat für die glykolytisch hoch aktiven Endothelzellen [13] zugesetzt.

Glycin, Alanin und Tryptophan

Um die Ausbildung unspezifischer Poren bei Hypoxie mit nachfolgendem Natriumeinstrom zu verhindern, enthält Custodioli-N die Aminosäure Glycin und das strukturverwandte Alanin [17, 28]. Das aus der HTK-Lösung bewährte Tryptophan wurde beibehalten [28].

Aspartat und α -Ketoglutarat

Aspartat und α -Ketoglutarat sind in Custodioli-N enthalten, um Intermediate des Zitratzyklus oder deren Vorstufen bereitzustellen [28] und wurden – wie die oben genannten Aminosäuren – aufgrund ihrer Unbedenklichkeit ohne erneute Testung für die Gefäßprotektionslösung übernommen.

Untersuchungen mit der neuen Lösung/Ti Protec® in weiteren Gefäßmodellen

Aufgrund der guten Ergebnisse wurde die neue Gefäßprotektionslösung in funktionellen

Tab. 1 Zusammensetzung der Organprotektionslösung Custodioli-N und der Gefäßprotektionslösung Ti Protec®

	Custodioli-N	Ti Protec®
Cl ⁻	30	103
α -Ketoglutarat	2	2
Aspartat	5	5
H ₂ PO ₄ ⁻	-	1
Na ⁺	16	16
K ⁺	10	93
Mg ²⁺	8	8
Ca ²⁺	0,02	0,05
Histidin	124	-
N-Acetylhistidin	57	30
Glycin	10	10
Alanin	5	5
Tryptophan	2	2
Arginin	3	-
Saccharose	33	30
Glukose	-	10
Desferal	0,0153	0,082
LK 614	0,0062	0,017
pH (20°C)	7,0	7,0
Osmolarität (mosm/l)	305	305

Die Konzentrationen aller Substanzen sind in mM angegeben.

Untersuchungen in weiteren Gefäßmodellen getestet. Kraftmessungen mit einem MULVANY-Messgerät zeigten bei Rattenmesenterialgefäßen signifikant bessere Ergebnisse hinsichtlich der endothelabhängigen und der endothelunabhängigen Relaxation sowie der Wandspannung nach Lagerung in der neuen Lösung im Vergleich zu HTK-Lösung und physiologischer Kochsalzlösung [30].

Die neue Gefäßprotektionslösung, aus galenischen Gründen bezüglich der Eisenchelatorkonzentrationen nochmal marginal verändert und nun unter dem Namen Ti Protec® verfügbar (Zusammensetzung **Tab. 1**), wurde dann zur Lagerung der in der kardiovaskulären Chirurgie für Bypassoperationen eingesetzten humanen A. mammaria interna verwendet. In physiologischer Kochsalzlösung gelagerte A. mammaria interna zeigte bereits nach 4 Stunden Lagerung deutliche Funktionseinschränkungen und nach 12 Stunden einen kompletten Verlust der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatation. In Ti Protec® gelagerte A. mammaria interna hingegen zeigte

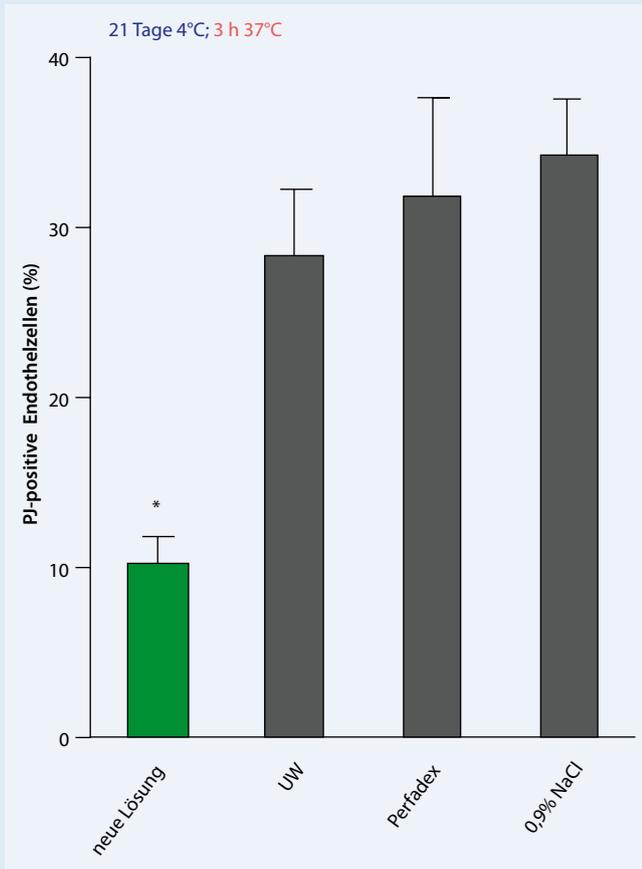


Abb. 4 ◀ Vergleich der neuen Lösung mit den derzeit in der Klinik eingesetzten Lösungen. Schweine-aortensegmente wurden für 21 Tage bei 4°C in der neuen Lösung, UW-, Perfadex-Lösung und physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelagert und nach anschließender dreistündiger Wiedererwärmung mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. * Signifikant unterschiedlich zu allen drei anderen Lösungen, $p < 0,05$. (Aus [27], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

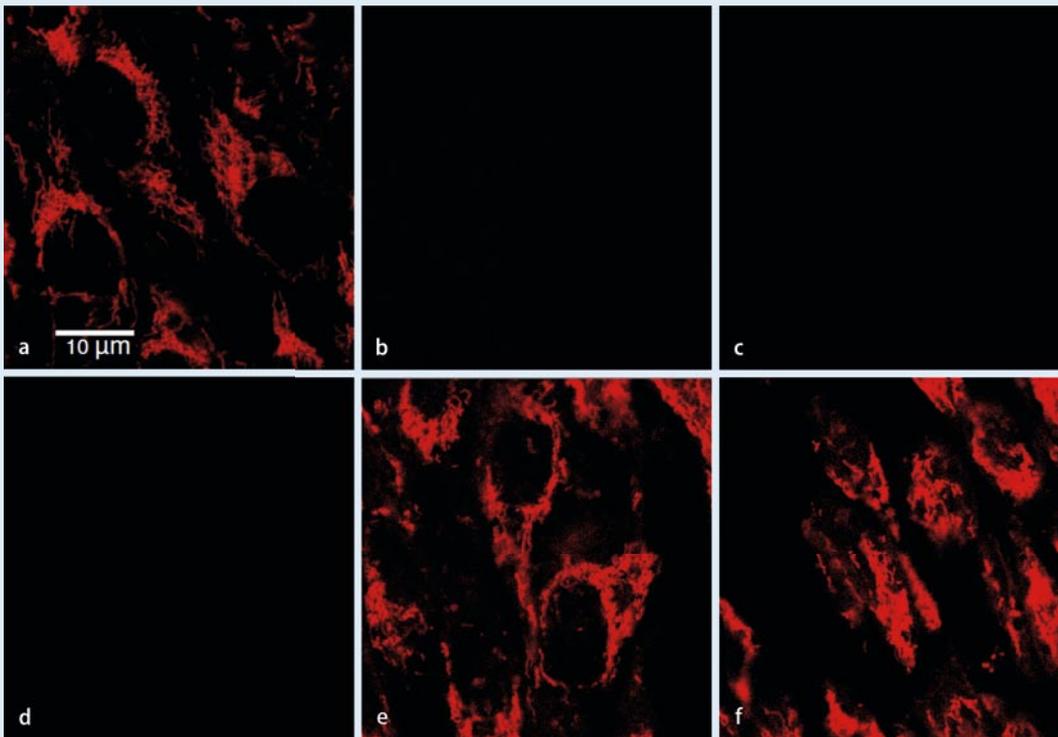


Abb. 5 ◀ Beurteilung des mitochondrialen Membranpotenzials von Schweine-aortenendothelzellen in Aortensegmenten nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung. Aortensegmente (nichtgelagerte Kontrolle, **a**) wurden bei 4°C für 7 Tage in HTK (**b**), 0,9% NaCl (**c**), Perfadex (**d**) und der neuen Lösung (**e**) oder für 14 Tage in der neuen Lösung (**f**) gelagert und anschließend drei Stunden bei 37°C wiedererwärmt. Das mitochondriale Membranpotenzial wurde mittels Laserscanningmikroskopie nach Fluoreszenzfärbung mit Tetramethylrhodamin-Methylester untersucht. (Teile aus [27], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

nach 4 Tagen Kaltlagerung noch keinerlei Funktionsverlust. Selbst nach 10 Tagen Lagerung war noch $\geq 50\%$ der Funktion frischer Gefäße nachweisbar ([6] und S. Garbe, A. Deussen, 2009, unveröffentlichte Ergebnisse).

Fazit für die Praxis

- Die hier entwickelte Gefäßprotektionslösung verbessert das Endothelzellüberleben und die Endothelzellfunktion sowie die glattmuskuläre Funktion bei/nach Kaltlagerung von Gefäßen erheblich. Sie ermöglicht, Gefäße für längere Zeiten bei minimalem Qualitätsverlust zu lagern.
- Die Gefäßprotektionslösung wurde mittlerweile unter dem Namen **Ti Protec®** zugelassen.

Korrespondenzadressen

Dr. Timo Wille



Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr
Neuherbergstr. 11
80937 München
timo.wille@uni-due.de

Prof. Dr. U. Rauen



Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55, 45122 Essen
ursula.rauen@uni-duisburg-essen.de

Interessenkonflikt. Prof. Dr. Rauen ist als Berater für Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim, tätig. Dr. Wille erhielt einen Reisekostenzuschuss dieser Firma.

Literatur

1. Blankensteijn JD, Terpstra OT (1991) Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 13:1235–1250
2. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM (1992) Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53:977–978
3. Collins GM, Bravo-Shugartman M, Terasaki PI (1969) Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 2:1219–1222
4. Del Gaudio M, Grazi GL, Ercolani G et al (2005) Outcome of hepatic artery reconstruction in liver transplantation with an iliac arterial interposition graft. *Clin Transplant* 19:399–405
5. Fahner PJ, Idu MM, van Gulik TM et al (2006) Systemic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *J Vasc Surg* 44:518–524
6. Garbe S, Zatschler B, Müller B et al (2009) Improvement of vessel graft storage in a new preservation solution on human internal mammary artery (HIMA). *Acta Physiologica* 195(Suppl 669):3
7. Gizewski ER, Rauen U, Kirsch M et al (1997) Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem J* 322:693–699
8. Kerkweg U, Jacob M, de Groot H et al (1997) Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 76:501–508
9. Kerkweg U, Li T, Groot H de et al (2002) Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 35:560–567
10. Kieffer E, Gomes D, Chiche L et al (2004) Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 39:1009–1017
11. Lang F, Föllmer M, Lang KS et al (2005) Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205:147–157
12. Lee J, Drinkwater DC, Laks H et al (1996) Preservation of endothelium-dependent vasodilation with low-potassium University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112:103–110
13. Mertens S, Noll T, Spahr R et al (1990) Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am J Physiol* 3:H 689–H 694
14. Nishimura Y, Romer LH, Lemasters JJ (1998) Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology* 27:1029–1039
15. Pearl JM, Laks H, Drinkwater DC et al (1994) Loss of endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107:257–264
16. Rauen U, Groot H de (1998) Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic Biol Med* 24:1316–1323
17. Rauen U, Groot H de (2004) New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 52:299–309
18. Rauen U, Kerkweg U, Groot H de (2007) Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 54:77–86
19. Rauen U, Kerkweg U, Weisheit D et al (2003) Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med* 35:1664–1678
20. Rauen U, Klempert S, Groot H de (2007) Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell Mol Life Sci* 64:192–205
21. Rauen U, Petrat F, Li T et al (2000) Hypothermia injury/cold-induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O_2/H_2O_2 formation. *FASEB J* 14:1953–1964
22. Rauen U, Polzar B, Stephan H et al (1999) Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 13:155–168
23. Robless P, Okonko D, Mikhailidis DP et al (2004) Dextran 40 reduces in vitro platelet aggregation in peripheral arterial disease. *Platelets* 15:215–222
24. Salahudeen AK, Huang H, Patel P et al (2000) Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation* 70:1424–1431
25. Schroeder C, Heintz A, Pexa A et al (2007) Preclinical evaluation of coronary vascular function after cardioplegia with HTK and different antioxidant additives. *Eur J Cardiothorac Surg* 31:821–826
26. Wille T (2010) Optimierung der kalten Lagerung von Blutgefäßen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
27. Wille T, Groot H de, Rauen U (2008) Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J Vasc Surg* 47:422–431
28. Wu S, Wohlschlaeger J, Groot H de et al (2009) Evaluation of a modified HTK solution containing the new iron chelator LK 614 in an isolated rat liver perfusion model. *J Invest Surg* 22:340–347
29. Zacharias A, Habib RH, Schwann TA et al (2004) Improved survival with radial artery versus vein conduits in coronary bypass surgery with left internal thoracic artery to left anterior descending artery grafting. *Circulation* 109:1489–1496
30. Zatschler B, Dieterich P, Müller B et al (2009) Improved vessel preservation after 4 days of cold storage: Experimental study in rat arteries. *J Vasc Surg* 50:397–406