(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Dezember 2004 (23.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/110145 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A01N 1/02, A61B 19/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/006309

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juni 2004 (11.06.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 26 764.6 13. Juni 2003 (13.06.2003) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **BIOTEST AG** [DE/DE]; Landsteinerstrasse 5, 63303 Dreieich (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **NEES, Stephan** [DE/DE]; Waldwiesenstrasse 30b, 81375 München (DE). **NEES, Friderike** [DE/DE]; Waldwiesenstrasse 30 b, 81375 München (DE).

(74) Anwälte: **VOSSIUS, Volker** usw.; Geibelstrasse 6, 81679 München (DE).

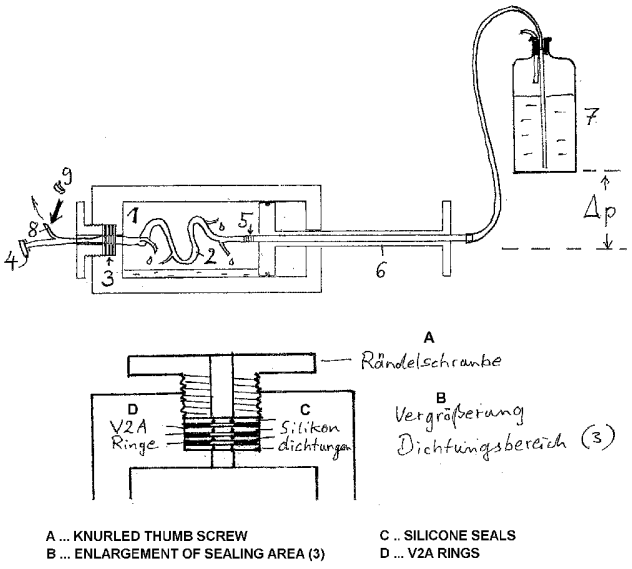
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR PRESERVING THE ENDOTHELIUM IN ISOLATED HOLLOW ORGANS AND BIOLOGICAL VESSELS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND APPARATUR ZUR KONSERVIERUNG DES ENDOTHELS IN ISOLIERTEN HOHLORGANEN UND BIOLOGISCHEN GEFÄSSEN



A ... KNURLED THUMB SCREW
B ... ENLARGEMENT OF SEALING AREA (3)
C .. SILICONE SEALS
D ... V2A RINGS

(57) Abstract: The invention relates to a method and an apparatus for the endothelium-preserving treatment of isolated hollow organs, especially biological vessels such as blood vessels and lymphatic vessels by means of endothelium-protective perfusates or incubation solutions containing at least 0.1 percent by weight of native albumin and a nutrient substrate, preferably L-glutamine. Also disclosed are the use of the endothelium-protective perfusates for preparing hollow organs or biological vessels as a transplant for the treatment of organ diseases or vascular diseases, the use thereof for repairing endothelial lesions in isolated hollow organs and/or biological vessels, and the use thereof for preserving organs and/or vessels.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/110145 A1

GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen, insbesondere, isolierten biologischen Gefässen, wie Blutgefässen und Lymphgefässen durch Endothel-protektive Perfusionslösungen bzw. Inkubationslösungen die mindestens 0,1 gew.% natives Albumin und ein Nährstoffsubstrat, vorzugsweise L- Glutamin, enthalten, die Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösungen zur Vorbereitung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefässen als Transplantat zur Behandlung von Organ- oder Gefässerkrankungen, deren Verwendung zur Reparatur von Endothelläsionen in isolierten Hohlorganen und/oder biologischen Gefässen und deren Verwendung zur Organund/oder Gefässkonservierung.

Verfahren und Apparatur zur Konservierung des Endothels in isolierten Hohlorganen und biologischen Gefäßen

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur Behandlung und Konservierung des Endothels in isolierten Hohlorganen, insbesondere isolierten biologischen Gefäßen, wie Blutgefäßen und Lymphgefäßen, durch eine Albumin-haltige Endothel-protektive Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung, die Verwendung einer Endothel-protektiven Perfusionslösung zur Vorbereitung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen als Transplantat zur Behandlung von Organ- oder Gefäßerkrankungen, deren Verwendung zur Reparatur von Endothelläsionen in isolierten Hohlorganen und/oder biologischen Gefäßen und deren Verwendung zur Organ- und/oder Gefäßkonservierung.

Ein durch Arteriosklerose hervorgerufener Verschluss von Blutgefäßen ist in vielen westlichen Ländern Ursache für eine Vielzahl von Organerkrankungen. Eine Gefäßtransplantation, d.h. der Austausch von kranken, verengten oder verschlossenen biologischen Gefäßen durch gesunde Ersatzgefäße, hat daher für die Behandlung solcher Erkrankungen einen hohen klinischen Stellenwert. So sterben beispielsweise alleine in der Bundesrepublik Deutschland etwa 200 000 Menschen pro Jahr an einem Herzinfarkt in Folge eines arteriosklerotischen Verschlusses einer oder mehrerer Koronararterien.

Ein weiteres durch Arteriosklerose verursachtes und weit verbreitetes Krankheitsbild ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Etwa 5-10% der Erwachsenen leiden an peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen, was drastische Maßnahmen an den Patienten, wie eine Amputation von Gliedmaßen, bei etwa 35 000 Menschen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland erforderlich macht. Durch eine rechtzeitige chirurgisch durchgeführte Überbrückung der krankhaft veränderten biologischen Gefäßen mit einem geeigneten Gefäßersatz, können auch in solchen Fällen die Patienten bzw. deren Gliedmaßen behandelt und gerettet werden.

In der Bypass-Chirurgie werden bislang verschiedene Gefäßersatzmaterialien eingesetzt, die entsprechend ihrer Herkunft in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können: 1. autologer (= körpereigener) Gefäßersatz, 2. Bioprothesen und 3. Kunststoffprothesen. Dabei können die beiden ersten Gefäßersatzmaterialien als „biologischer Gefäßersatz" bezeichnet werden. Bei den Bioprothesen lässt sich wiederum zwischen homologen (aus der gleichen Spezies gewonnenen) und heterologen (aus einer fremden Spezies gewonnenen) Gefäßprothesen unterscheiden. Bei den Kunststoffprothesen handelt es sich um einen alloplastischen (griech. „allo" = anders, fremd) Gefäßersatz, bei dem bevorzugt inerte, poröse Kunststoffe wie Polyester (Dacron®) oder Polytetrafluorethylen (PTFE; Teflon®) verwendet werden.

Das wichtigste und am meisten bevorzugte Ausgangsmaterial in der Gefäßchirurgie, insbesondere in der Bypass-Chirugie, sind autologe Transplantate. Bei den biologischen Gefäßen wird dazu bevorzugt die *Vena saphena magna* oder die *Arteria thoracica interna* (= *Arteria mammaria int.*) verwendet. Beide Gefäße werden vorzugsweise in der Koronarchirurgie eingesetzt. Die Verwendung von körpereigenen Gefäßen liefert im Vergleich zu anderen Gefäßtransplantaten die besten Resultate im Hinblick auf die sogenannten „Offenheitsraten". Darunter versteht man die Anzahl der nach einer bestimmten Zeit noch offenen Gefäße nach einer Gefäßtransplantation.

In der Koronarchirurgie sind immerhin 80-95% der *Arteria mammaria int.*-Bypässe, aber nur 65-80% der verwendeten Venen-Bypässe, nach 5 Jahren noch offen. Dabei ist zu beachten, dass 20% der transplantierten biologischen Gefäße schon innerhalb des ersten Jahres nach der Implantation lebensbedrohlich verengt bzw. verschlossen sind. Wiederkehrende Operationen sind bereits nach 10 Jahren in 8-16% der Fälle bei Venen-Bypässen und in etwa 8% der Fälle bei *Arteria mammaria int.*-Bypässen erforderlich.

Diese Zahlen verdeutlichen, dass selbst ein autologer Gefäßersatz, der zwar gegenüber den anderen Gefäßprothesenarten eine Reihe Vorteile aufweist, in der chirugischen Praxis immer noch mit erheblichen Ausfällen verbunden ist. Diese Ausfälle basieren auf Gefäßverschlüssen. Daher kann auch ein autologer Gefäßersatz oft kein zufriedenstellendes Ergebnis für die Transplantation darstellen. Aufgrund der beobachteten Ausfälle bei den transplantierten Gefäßen und den damit verbundenen Komplikationen erscheint zunächst eine Verbesserung des üblichen chirurgischen Vorgehens dringend erforderlich. Immerhin sind

offene und gut funktionierende biologische Gefäße für den Organismus lebensnotwendig und für das Überleben von Patienten essentiell.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, dass der entscheidende Grund für den akuten Verschluss (Thrombosierung) von biologischen Gefäßen und einer Restenose, welche durch die intimale Wandverdickung verursacht wird und den damit verbundenen Ausfällen, auf den heute noch in der chirugischen Praxis üblichen Umgang mit biologischen Gefäßen bei Gefäßtransplantationen zurückzuführen ist.

Untersucht man chirugisch entnommene und bis zur Implantation üblicherweise in kristalloiden Lösungen (z.B. Kochsalzlösung, Bretschneider-Lösung) aufbewahrte *Vena saphena*-Segmente, so lässt sich – unabhängig von den jeweiligen betroffenen Bereichen – fast durchweg eine erschreckend schlechte Erhaltung des luminalen Endothels der Gefäße feststellen. Das Endothel (Endothelium, Endothel-Gewebe) bildet die Innenoberfläche von sämtlichen biologischen Gefäßen und Organsystemen. Endothel ist ein Bestandteil der Intima (= *Tunica intima*). Die Intima besteht aus einschichtigen Endothel und dem *Stratum subendotheliale* (feines lockeres Bindegewebe mit den von den Erfindern entdeckten subendothelialen Perizyten) sowie der gefensterten *Membrana elastica interna* und erfüllt wichtige biologische Funktionen die für den Erhalt der Blutgefäßfunktion essentiell sind. Im Prinzip stellt das Endothel den eigentlichen Blutbehälter des Körpers dar.

Mehr als 50% der routinemäßig verwendeten Bypass-Gefäße besitzen überhaupt kein luminales Endothel mehr. Der Grund liegt darin, dass die autologen Gefäßtransplantate vor der Gefäßtransplantation, teilweise unter starken mechanischen Beanspruchungen mit herkömmlichen Inkubationslösungen, z.B. mit Saline („physiologische Kochsalzlösung“) oder Bretschneider-Lösung, behandelt werden, um so die Gefäße blutfrei zu bekommen und um ihre Dichtigkeit zu überprüfen. Organe bei Transplantationen werden zum Beispiel mit University of Wisconsin (UW)-Lösung, Carolina Rinse-Lösung und HTK-Lösung behandelt, ohne dabei der Funktion des Endothels eine Bedeutung beizumessen. Von den Erfindern der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass ein solches in der Praxis übliches Behandlungsverfahren zu einer beträchtlichen Beeinträchtigung der Endothelfunktion führt, was bis zur völligen Zerstörung des Endothel-Gewebes führen kann. Die Beeinträchtigung oder gar die Zerstörung des Endothel-Gewebes ist aber, wie oben erwähnt, ein Grund warum

sich biologische Gefäß- oder Organtransplantate unter Umständen schon bald nach ihrer Implantation wieder verschließen.

Neben der Behandlung der Gefäße mit Saline, sind die biologischen Gefäße bei deren Behandlung, d.h. während ihrer Isolation und Implantation, starken mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt, da die Gefäße üblicherweise, ähnlich einem gefalteten Schlauch, über eine dicke Knopfkanüle gezogen und mit der Saline-Lösung sowie einer angesteckten Spritze unter einem unkontrollierbaren hohen Druck gesetzt werden. Anschließend wird das Gefäß Stück für Stück zum Auffinden der Gefäß-Seitenäste, aus denen in diesem Moment Flüssigkeit heraustritt, von der Knopfkanüle heruntergeschoben und die Seitenäste mit passenden chirugischen Klemmen unmittelbar ligiert. Schließlich wird das für Transplantationszwecke fertig präparierte Gefäßsegment in seiner gesamten Länge zum Testen der Dichtigkeit noch einmal unter hohem Druck gesetzt, was mit einem regelrechten „Aufblasen" des isolierten Gefäßes verbunden ist. Durch den hohen Druck dem das Gefäß dabei ausgesetzt ist, wird ein großer Teil, und häufig der letzte Rest, der luminalen Endothel-Schicht abgerissen und weggespült.

Damit wird deutlich, dass durch diese in der chirugischen Praxis übliche Behandlung der biologischen Gefäße die innerste Wand der Gefäßtransplantate, die Intima (= *Tunica intima*) und deren luminales Endothel-Gewebe, stark beschädigt wird.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, dass dem luminalen Endothel-Gewebe eine erhebliche Bedeutung im Hinblick auf den akuten Erhalt der Gefäßfunktion (Freihaltung von thromboembolischen Reaktionen zum Zwecke einer ungehinderten Flüssigkeitsleitung) und der längerfristigen Freihaltung des Gefäß-Lumens (Verhinderung von arteriosklerotischen Stenosen und schließlich Thromboembolie) zukommt.

Eine Zerstörung der Endothel-Schicht - wie zum Beispiel durch die oben geschilderte Behandlung von autologen Gefäßtransplantaten - begünstigt nämlich eine Thrombosierung des betroffenen Gefäßes. Es ist bekannt, dass nur eine geschlossene, gesunde und somit auch stoffwechselaktive Endothelauskleidung durch komplexe „anti-aggregatorische" (Thrombozyten-hemmende), „anti-koagulatorisch wirkende" (Gerinnungs-hemmende) und „pro-fibrinolytische" (Fibrin-auflösende) Aktivitäten in ständiger Weise das

Zustandekommen von thrombotischen Ablagerungen innerhalb des Kreislaufsystems eines Organismus verhindert.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben hinreichende Belege dafür, dass im Bereich von Endothelläsionen, in denen die erwähnten antithrombogenen Funktionen nicht mehr ausgeübt werden können, das Gefäß noch auf zusätzliche Weise zur Thrombosierung neigt. In der Intima aller großen Blutgefäße liegen nämlich subendothelial lokalisierte „Perizyten-ähnliche" Zellnetze, die extrem hohe Konzentrationen des sogenannten „Gewebefaktors" (TF = „Tissue Factor") exprimieren. Der Gewebefaktor (TF) ist ein integrales membranständiges Glykoprotein, das beim Menschen von diesem Zelltypus konstitutiv exprimiert wird. Dieses Membranprotein übernimmt bei der Blutgerinnung als Aktivator des Faktors VII eine entscheidende Funktion und ist damit nach neueren Erkenntnissen für die Auslösung fast aller klinisch relevanten Thrombosierungsprozesse verantwortlich. Ein gesundes, geschlossenes Endothel schirmt den vor allen von den Perizyten exprimierten Gewebefaktor physiologischerweise vollständig von dem innerhalb der Gefäße strömenden Blut ab. Durch die damit erreichte Abschirmung des Gewebefaktors vom Blutstrom mittels des zwischengeschalteten intakten Endothel-Gewebes wird einer akuten Thrombosierung und damit einem akuten Verschluss der biologischen Gefäße vorgebeugt. Ein Grund für die Zerstörung des Endothels bei Verwendung von Kochsalzlösung bei Behandlung von Transplantaten dürfte sein, dass wenig oder kein Energie- und Erhaltungsstoffwechsel mehr im Endothel-Gewebe stattfinden kann. Dies verdeutlicht vor allem, dass die kurzfristige (akute) Offenheitsrate eines biologischen Gefäßes ganz wesentlich von dem Zustand des Endothel-Gewebes innerhalb des Gefäßes abhängt.

Dabei muss beachtet werden, dass die Erzeugung einer geschlossenen Endothel-Schicht kein einmaliges Ereignis ist, denn diese Schicht muss auch ständig gegen die hohen Scherkräfte, die durch den Blutstrom bedingt sind, aufrecht gehalten werden. Im Einzelnen spielen auch hier wieder aktive Stoffwechselleistungen des Endothel-Gewebes eine entscheidende Rolle. Dazu gehören zum Beispiel ständige Verfugungsprozesse, d.h. das Verschließen der dichten Interzellularspalten durch spezifische Proteine sowie kontinuierliche Zellteilungsprozesse, die vor allem für die Abdeckung und Reparatur von Läsionen (Verletzungen) an der intimalen Oberfläche notwendig sind. Bei diesen Prozessen kommt vor allem der Glykokalyx, einer Gel-artigen Oberflächenschicht, große Bedeutung zu.

Von den Erfindern der vorliegenden Erfindung wurde außerdem erkannt, dass die ständige (chronische) Erhaltung und die Regenerationsfähigkeit von Endothel-Gewebe auch für die längerfristige Funktion der Gefäßwand und somit der biologischen Gefäße essentiell sind. Eine intakte und dichte Endothel-Schicht ist nämlich zur Schaffung und Aufrechterhaltung eines speziellen Milieus in der Intima bei der Kontrolle der subendothelialen Zellverbände notwendig. Diese Zellverbände erstrecken sich unterhalb des Endothels als dünnes Netzwerk, die bei Gefäßwandverletzungen zwar sofort hämostatisch reaktionsbereit sind, das Lumen aber in keiner Weise einschränken. Wird das Endothel jedoch verletzt oder erkrankt dieses Gewebe, gelangen Wachstumsfaktoren aus dem Plasma in diese Intima-Schichten, mit der Folge einer massiven und weiter zunehmenden Proliferation der subendothelialen Zellverbände. Die Folge davon ist eine langfristig ablaufende, zunehmend sklerotisierende Umformung der Wand des biologischen Gefäßes, eine Einengung des Lumens und schließlich die chirurgisch gefürchtete Restenosierung. Unter „Restenosierung" versteht man hierbei die wiederkehrende Verengung von Gefäßen oder Gefäßtransplantaten was mit einem Verlust der Durchblutung im betroffenen Gewebebereich verbunden ist.

Aus dem zuvor beschriebenen wird deutlich, dass die bisher auf Gefäß-chirugischem Gebiet verwendeten und beschriebenen Verfahren zur Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen zu einer Beeinträchtigung bzw. zu einer Zerstörung des luminalen Endothel-Gewebes führen, was wiederum in eine schnelle oder langfristige Restenosierung der Gefäße resultiert. Als Folge ist ein erneuter chirugischer Eingriff in den betroffenen Patienten notwendig, die nun natürlich auch eine deutlich verschlechterte Prognose bezüglich ihres Krankheitsverlaufs haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, schonende Verfahren und Perfusionslösungen zur Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen zur Verfügung zu stellen, die eine Konservierung, d.h. eine Aufrechterhaltung und gegebenenfalls auch eine Regeneration, der Endothel-Schicht der Gefäße ermöglichen, um auf diese Weise zuverlässige und langfristig einsetzbare Organ- und Gefäßtransplantate zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Ansprüche 1-54 gelöst.

Somit betrifft die Erfindung Endothel-protektive Perfusionslösungen bzw. Inkubationslösungen, die Verwendung hier beschriebener Endothel-protektiven Perfusionslösungen und Verfahren zu Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen und/oder biologischen Gefäßen, umfassend das In-Kontakt-Bringen des Hohlorgans oder Gefäßes mit einer Endothel-protektiven Perfusionslösung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung und Konservierung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen und Gefäßsystemen, bei dem das Hohlorgan bzw. das biologische Gefäß mit einer erfindungsgemäßen Endothel-protektiven Perfusionslösung (Inkubationslösung) behandelt wird.

Der Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen umfasst das In-Kontakt-Bringen eines isolierten Hohlorgans mit einer Endothel-protektiven Perfusionslösung, wobei die Endothel-protektive Perfusionslösung mindestens die folgenden Bestandteile umfasst:

(a) physiologische Elektrolytlösung
(b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin
(c) Nährstoffsubstrat;

wobei die Behandlung zur Konservierung und/oder Reparatur des Endothel-Gewebes im Lumen des Hohlorgans führt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch 1-10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch 2,5 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch 5 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch 10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch ein homologes anti-koaguliertes Blutplasmapräparat ersetzt, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das anti-koagulierte Blutplasmapräparat Natrium-Ionen, Kalium-Ionen, Calcium-Ionen, Magnesium-Ionen, Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, Albumin und Immunglobuline.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das anti-koagulierte Blutplasmapräparat folgende Zusammensetzung: Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa 50-200 mM Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, davon etwa 25-45 g/l Albumin, 3-15 g/l IgG, 1-10 g/l IgA und 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline, bei einem pH-Wert von etwa 7,3 bis etwa 7,8 und einer Osmolarität von etwa 200-350 mosmol/kg.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Nährstoffsubstrat in der Endothel-protektiven Perfusionslösung L-Glutamin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung zwischen 0,5 bis 10 mM, vorzugsweise 2,5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung 5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin 7,5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die physiologische Elektrolytlösung folgende Bestandteile: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM $MgSO_4$; 0,5-2 mM KH_2PO_4; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM $CaCl_2$.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die physiologische Elektrolytlösung Energiesubstrate, vorzugsweise 2-10 mM Glukose und/oder 1-10 mM Pyruvat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die physiologische Elektrolytlösung 0,1-0,6 U/ml Heparin und/oder jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt der pH-Wert in der physiologischen Elektrolytlösung in atmosphärischer Luft 7,4 +/- 0,04.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Endothel-protektive Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Antibiotika um 50-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin.

In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Endothel-protektive Perfusionslösung ein von Gerinnungsfaktoren und Isoagglutininen befreites Blutplasmapräparat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Blutplasmapräparat folgende Bestandteile: 100-170 mM Natrium-Ionen, 1-15 mM Kalium-Ionen, 1-6 mM Calcium-Ionen, 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, 50-200 mM Chlorid-Ionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wurde das Blutplasmapräparat mit β-Propiolacton und UV-Bestrahlung zur Virusinaktivierung behandelt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung einen oder mehrere Endothel-fördernde Wachstumsfaktoren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Wachstumsfaktor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) und Stammzell-Faktor (SCF).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung Flavonoide wie Quercetin oder Rutoside, wie Trihydroxyethyl-Rutosid, oder Derivate davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung vasodilatorische Substanzen wie Papaverin, Adenosin oder kardioplegische KCl-Konzentrationen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Hohlorganen um Herz, Darm, Uterus, Niere, Harnblase, Lunge, Leber, Milz.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Hohlorganen um biologische Gefäße oder Gefäßsysteme.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den biologischen Gefäßen um Blutgefäße oder Lymphgefäße.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Endothel-protektive Perfusionsflüssigkeit mit Hilfe einer erfindungsgemäßen Apparatur durch das Hohlorgan geleitet.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter eine Endothel-protektive Perfusionslösung, die mindestens die folgenden Bestandteile umfasst:

(a) physiologische Elektrolytlösung
(b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin
(c) 0,5 bis 10 mM L-Glutamin

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin durch 1-10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin durch 2,5 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin durch 5 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das native Albumin durch 10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin 2,5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin 5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Konzentration von L-Glutamin 7,5 mM.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die physiologische Elektrolytlösung folgende Bestandteile: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM $MgSO_4$; 0,5-2 mM KH_2PO_4; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM $CaCl_2$.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die physiologische Elektrolytlösung Energiesubstrate, vorzugsweise 2-10 mM Glukose und/oder 1-10 mM Pyruvat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die physiologische Elektrolytlösung 0,1-0,6 U/ml Heparin und/oder jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt der pH-Wert in der physiologischen Elektrolytlösung in atmosphärischer Luft 7,4 +/- 0,04.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Endothel-protektive Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Antibiotika um 50-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin.

Bei einem weiteren Aspekt der Erfindung handelt es sich bei der Perfusionslösung um ein anti-koaguliertes und nicht-agglutinierendes Blutplasmapräparat, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das anti-koagulierte Blutplasmapräparat Natrium-Ionen, Kalium-Ionen, Calcium-Ionen, Magnesium-Ionen, Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, Albumin und Immunglobuline.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das anti-koagulierte Blutplasmapräparat folgende Zusammensetzung: Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa 50-200 mM Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, davon etwa 25-45 g/l Albumin, 3-15 g/l IgG, 1-10 g/l IgA und 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline, bei einem pH-Wert von etwa 7,3 bis etwa 7,8 und einer Osmolarität von etwa 200-350 mosmol/kg.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wurde das Blutplasmapräparat mit β-Propiolacton und UV-Bestrahlung zur Virusinaktivierung behandelt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung Endothel-Wachstumsfaktoren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Wachstumsfaktoren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) und Stammzell-Faktor (SCF).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung Flavonoide wie Quercetin oder Rutoside, wie Trihydroxyethyl-Rutosid, oder Derivate davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Perfusionslösung vasodilatorische Substanzen wie Papaverin, Adenosin oder kardioplegische KCl-Konzentrationen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen, umfassend eine Kammer (1), ein axial beweglicher Stempel (6), eine Kanüle (5), ein Vorratsbehälter (7), der Endothel-konservierende Perfusionsflüssigkeit enthält und eine Dichtungsvorrichtung (3), wobei die Kanüle mit dem axial beweglichen Stempel (6) verbunden ist, so dass die Kanüle mit dem Stempel in die Kammer bewegt werden kann und wobei die Dichtungsvorrichtung (3) ein Ende des Gefäßes umschließen kann und die Kanüle mit dem anderen Ende des Gefäßes verbunden werden kann, so dass die Endothel-protektive Perfusionslösung aus dem Vorratsbehälter (7), vorzugsweise unter einem Druckgradienten, selektiv in das biologische Gefäß geleitet werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Dichtungsvorrichtung Dichtungsscheiben, die stapelförmig in einer Rändelschraube angeordnet sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform haben die Dichtungsscheiben einen Durchmesser von 1-10 mm und/oder eine Dicke von 0,3-3 mm.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Apparat zusätzlich eine Thermostatisierungseinrichtung zum Erwärmen der Perfusionsflüssigkeit.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Perfusionslösung, welche in der Apparatur verwendet wird, eine der zuvor genannten und definierten Lösungen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer der zuvor genannten Endothel-protektiven Perfusionslösungen zur Konservierung von isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen, wobei die Perfusionslösung geeignete Bedingungen schafft, um das Endothel-Gewebe im Lumen der Hohlorgane oder biologischen Gefäße zu erhalten und/oder zu erneuern.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung zur Aufrechterhaltung und/oder Reparatur des Endothel-Gewebes in isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung zur Therapie und/oder Vorbeugung von Gefäßverschlüssen in isolierten Hohlorganen oder biologische Gefäßen.

Die vorliegende Erfindung umfasst des Weiteren Kombinationen der Zusammensetzungen der hier beschriebenen erfindungsgemäß eingesetzten Perfusionslösungen entsprechend ihren einzelnen Ausführungsformen. Der Fachmann wird erkennen, dass die Zusammensetzung der Endothel-protektiven Perfusionslösung je nach Anwendungsgebiet und Verwendungszweck variieren kann und zusätzliche Bestandteile enthalten kann, die für die Erhaltung der Funktion des Endothel-Gewebes von Bedeutung sind.

DEFINITIONEN

Unter dem Begriff „Endothel" oder „Endothel-Gewebe" versteht man eine einschichtige zelluläre Auskleidung der biologischen Gefäße und der serösen Höhlen.

Der Begriff „Endothelzelle" bezeichnet sowohl ausdifferenzierte im Verband organisierte Endothelzellen als auch noch nicht ausdifferenzierte Endothel-Vorläuferzellen.

Unter dem Begriff „Endothel-protektive Perfusionslösung" versteht man eine Lösung mit der das Endothel-Gewebe in isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen behandelt werden kann, wobei die Konsistenz des Endothel-Gewebes erhalten bleibt. Eine Ablösung oder Zerstörung des Endothels wird durch Anwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung verhindert. Durch die erfindungsgemäße Endothel-protektive Perfusionslösung wird die Teilungsfähigkeit der Endothelzellen sowie die Regenerationsfähigkeit des Gewebes aufrechterhalten. Die Perfusionslösung hat die Eigenschaft auch in kleinste Gefäße und Gefäßabschnitte einzudringen.

Unter dem Begriff „Endothel-protektiv" wird die Eigenschaft verstanden, dass das Endothel-Gewebe aufrechterhalten (konserviert), regeneriert und/oder verstärkt wird, d.h. dass das Endothel seine Gewebearchitektur und -struktur behält oder aufbaut. Darunter fallen sämtliche Endothel-schützende und Maßnahmen, die auf das Endothel (Endothel-Gewebe) fördernd wirken. Davon umfasst ist die Aufrechterhaltung des Zellverbandes des Endothel-Gewebes, die Aufrechterhaltung der inter-zellulären Kommunikation und die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Verbindungen. Weiter umfasst der Begriff das Anregen der Endothelzellen zur Teilung und die Zunahme der Endothelzellmasse pro Fläche.

Der Begriff „Perfusionslösung" schließt eine Lösung zur Konservierung von isolierten Hohlorganen und Gefäßen ein. Eine Perfusionslösung kann in synonymer Weise als „Inkubationslösung" verstanden werden.

Unter den Begriff „physiologische Elektrolytlösung" soll eine wässrige Lösung von Elektrolyten verstanden werden, die in physiologischer Weise in Vollblut anzutreffen sind. Der Begriff „physiologisch" soll hierbei nicht limitierend in Bezug auf die verwendete Konzentrationen der einzelnen Ionen zu sehen sein. Auch „unphysiologische" Konzentrationen, d.h. nicht natürlich im Organismus auftretende Konzentrationen fallen in den Umfang der vorliegenden Erfindung. Der Begriff „physiologisch" umfasst daher isotonische (synonym für „isoton") Lösungen, die einen einheitlichen osmotischen Druck und eine konstante molekulare Konzentration gewährleisten. Wird zum Beispiel, wie es bei einer kardioplegischen Lösung der Fall ist, der Kalium-Gehalt bzw. KCl-Gehalt erhöht, so muss die Gesamt-Ionenkonzentration der Lösung entsprechend angepasst werden, d.h. die Konzentration eines anderen Ions in der Lösung muss herabgesetzt werden, damit die Lösung isotonisch bleibt. Bevorzugte Perfusionslösungen sind mit dem Blut bzw. Plasma bei ca. 290 mosm/kg H2O isotonisch.

Unter dem Begriff „In-Kontakt-bringen" wird das Inkubation, Einlegen, Durchspülen oder in sonstiger Weise mit der Perfusionslösung behandelte Organ oder Gefäß verstanden für eine Zeit, die für die Erhaltung und/oder Erneuerung des Endothels in den Gefäßen ausreichend ist.

Unter dem Begriff „Hohlorgan" sollen im Folgenden ganz allgemein innere Organe und Organgefäßsysteme in Herz, Darm, Uterus, Niere, Harnblase, Lunge, Leber, Milz etc.

verstanden werden. Der Begriff „Hohlorgan" schließt aber auch wohl bekannte biologische Gefäße oder Gefäßsysteme ein, wie Blutgefäße (Arterien und Venen) und Lymphgefäße.

Unter dem Begriff „biologisches Gefäß" oder „Gefäß" werden sämtliche mit Endothel-ausgekleidete körpereigenen (autologen) Gefäße verstanden, die Körperflüssigkeit transportieren. Insbesondere werden darunter im Sinne dieser Erfindung Blutgefäße, wie Arterien und Venen, sowie Lymphgefäße verstanden.

Unter einem „Blutplasmapräparat" wird der flüssige, nach Entfernen der Blutkörperchen (durch Zentrifugieren) verbleibende Anteil des ungerinnbar gemachten Blutes verstanden, der im Gegensatz zum Serum keine Gerinnungsfaktoren enthält.

Unter dem Begriff „Agglutination" ist im Sinne der Erfindung die durch spezifische Antikörper (Agglutinine-vermittelte) Verklebung von Erythrozyten zu verstehen.

Unter dem Begriff „hämolysinfreies oder autologes Serum" wird ein Serum verstanden, in dem keine Antikörper (Isoagglutinine) vorhanden sind, welche die roten Blutkörperchen eines Empfängers binden könnten. Dadurch wird eine Komplementaktivierung und folglich eine Lyse (Auflösung) der Blutkörperchen verhindert. In einem autologen Serum, also in einem vom Patienten selbst stammenden Serum, sind solche Gefährdungspotentiale naturgemäß nicht vorhanden.

Unter dem Begriff „Nährstoffsubstrat" wird eine Aminosäure oder Protein verstanden, dass von der Zelle zur Energiegewinnung in den Energiestoffwechsel verarbeitet wird. Nährsubstrate sind üblicherweise Zucker, Fette oder Aminosäuren, die von der Zelle verbrannt und so zur Energiegewinnung eingesetzt werden.

Unter dem Begriff „Gefäßkrankheiten" werden Erkrankungen oder krankhafte Zustände von Blutgefäßen verstanden, wie beispielsweise Angiopathie, Vaskulitis, insbesondere Arterien- und Venenstenosen, Angina pectoris, Myokardinfarkt, (Herzinfarkt), Apoplexie (Schlaganfall), Hörsturz, Aneurysma, Arteriosklerose, Thrombose, Varikose, Thrombophlebitis, Claudicatio, Raucherbein und Gangrän.

DETAILIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Feststellung, dass die Endothel-Schicht von biologischen Gefäßen für die Erhaltung der Gefäße - auch nach der Transplantation - einen entscheidenden Faktor darstellt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und einer erfindungsgemäß verwendeten Perfusionslösung können sämtliche Endothel-tragende biologische Gefäße und Hohlorgane gezielt behandelt werden, so dass die Struktur und Funktion des Endothel-Gewebes und damit die Funktion des Gefäßes oder Hohlorgans erhalten bleiben.

Die Behandlung von isolierten Hohlorganen und biologischen Gefäßen mit den unten genauer beschriebenen Endothel-protektiven Perfusionslösungen und deren Abwandlungen ermöglicht die Vorbereitung von Organ- und Gefäßtransplantaten vor deren Implantation in den Körper (z.B. bei Tier oder Mensch) für einen Organ- und Gefäßersatz (Prothese oder Bypass) oder eignet sich für die Reparatur von Läsionen (d.h. Verletzungen) des Endothel-Gewebes in solchen Hohlorganen oder biologischen Gefäßen. Die gezielte Verwendung einer Inkubationslösung zur Behandlung von isolierten Organen und/oder Gefäßen für die Erhaltung des Endothel-Gewebes im Lumen solcher Organe und/oder Gefäße ist neu. Durch die Behandlung von isolierten Hohlorganen mit einer Albumin-haltigen Lösung, kann das Endothel in den Gefäßen konserviert und sogar repariert werden, indem die Endothelzellen im Zellverband gehalten, stabilisiert und zur Proliferation angeregt werden. Dadurch erhöht sich die Lebensdauer der Hohlorgane, wenn diese z.B. als Transplantat bei Operationen in Patienten eingesetzt werden.

Die hier beschriebenen Endothel-protektiven Perfusionslösungen eignen sich auch zur Verwendung für die Konservierung von Organen und Gefäßen von Säugetieren (Organ- und Gefäßkonservierung) durch Inkubation dieser Organe oder Gefäße in der Perfusionslösung. Eine solche Konservierung von Organen oder Gefäßen ist beispielsweise besonders in der Transplantationschirugie wünschenswert. Eine Konservierung kann aber auch notwendig sein, um Organe oder Gefäße für einen Transport zu schützen und funktionell zu erhalten. Ziel des erfindungsgemäßen Verfahrens und der dazu benutzen Perfusionslösung ist es, die Funktion, Leistungsfähigkeit und Beständigkeit des Organs oder Gefäßes zu gewährleisten, indem die luminale Endothelzellschicht aufrecht erhalten oder sogar regeneriert wird.

Ein funktionales und strukturell intaktes Endothel-Gewebe ermöglicht eine lange Lebensdauer von Gefäß-Prothesen, da auf diese Weise einem Verschluss der Gefäße, zum Beispiel durch Thrombosierung oder sklerotisierende Restenose, vorgebeugt wird.

Die Erfindung betrifft auch eine Apparatur mit der ein isoliertes biologisches Gefäß mit der Endothel-protektiven Perfusionslösung durchgespült werden kann. Mit dieser Apparatur können biologische Gefäße einfach und effizient auf ihre Dichtigkeit überprüft werden. Zudem können zum Beispiel alle Seitenäste des biologischen Gefäßes beim Durchspülen mit geeigneten Ligationshilfen, wie zum Beispiel Klemmen oder Micro-Clips, zielsicher gefunden und ligiert werden.

Die hier beschriebenen Ausführungsformen der Endothel-protektiven Perfusionslösungen eignen sich daher zur Verwendung für die Vorbereitung von biologischen Gefäßen als Transplantate für die Behandlung von Gefäßkrankheiten. Solche Gefäßkrankheiten oder krankhafte Zustände sind zum Beispiel Angiopathie, Vaskulitis, insbesondere Arterien- und Venenstenosen, Angina pectoris, Myokardinfarkt, (Herzinfarkt), Apoplexie (Schlaganfall), Hörsturz, Aneurysma, Arteriosklerose, Thrombose, Varikose, Thrombophlebitis, Claudicatio, Raucherbein und Gangrän.

Die Endothel-protektive Perfusionslösung eignet sich weiterhin zur Reparatur von Endothelläsionen im Organgefäßsystem von Hohlorganen und/oder in biologischen Gefäßen oder zur Konservierung ganzer Organe oder Gefäße oder Teilen davon zum Zwecke der Haltbarmachung bei Operationen, Transplantationen, Lagerung oder Transport.

Die mit der erfindungsgemäßen Endothel-protektiven Perfusionslösung behandelten Hohlorgane bzw. biologische Gefäße weisen ein ungeschädigtes Endothel und eine verbesserte Perfundierbarkeit der Gefäße im Vergleich zu unbehandelten oder mit herkömmlichen Lösungen, z.B. physiologischer Kochsalzlösung (Saline), Bretschneiderlösung, University of Wisconsin (UW)-Lösung, Carolina Rinse-Lösung und HTK-Lösung durchspülten bzw. inkubierten Hohlorgane oder Gefäßen auf. Durch die erfindungsgemäße Verwendung der hier beschriebenen Perfusionslösungen wird eine frühe Thrombosierung (Verschluss) des betreffenden Gefäßes verhindert oder zumindest zeitlich verzögert.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelten isolierten Hohlorgane bzw. biologische Gefäße haben daher gegenüber den bisher auf dem Gebiet der Organ- und Gefäßtransplantation eingesetzten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen den Vorteil, dass das Endothel-Gewebe des behandelten Hohlorgans oder Gefäßes intakt bleibt und sich sogar bei einem beschädigten Endothel-Gewebe regeneriert (z.B. durch Anregung der Proliferation von Endothelzellen).

Bei der Behandlung des Endothels mit einer erfindungsgemäßen Perfusionslösung findet somit auch eine Erneuerung des Endothel-Gewebes fest. Die Endothelzellen behalten ihre Teilungsfähigkeit und sind sogar in der Lage, Endothelläsionen der Hohlorgane bzw. biologischen Gefäße zu reparieren, was durch Anregung der Proliferation der Endothelzellen erreicht wird. Unbehandelte oder in der chirurgischen Praxis mit herkömmlicher physiologischer Kochsalzlösung behandelte Gefäße führen dagegen zu einer Läsion oder bereits innerhalb der ersten Stunde nach Behandlung zu einer vollständigen Ablösung des Endothels.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es weiterhin möglich, das mit einer hier beschriebenen Endothel-protektiven Perfusionslösung behandelte Hohlorgan bzw. biologische Gefäße für längere Zeit, d.h. für einen Zeitraum bis zu mehreren Tagen, aufzubewahren oder zu lagern. Dies ermöglicht eine einfache Handhabung bei der Lagerung der Gefäße, eine vereinfachte logistische Versorgung bei Transplantations- oder Bypass-Operationen sowie eine bessere Planung derartiger Eingriffe.

Die erfindungsgemäße Endothel-protektive Perfusionslösung umfasst in seiner Grundzusammensetzung eine physiologische Elektrolytlösung, mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin und ein Nährstoffsubstrat, wie z.B. L-Glutamin (2,5-10 mM).

Mit diesen Grundbestandteilen der erfindungsgemäßen Perfusionslösung (= Grundlösung) lässt sich überraschenderweise bereits eine Endothel-konservierende bzw. Endothel-erhaltende Wirkung in isolierten biologischen Gefäßen feststellen (siehe dazu Beispiele 1 und 2). Die physiologische Elektrolytlösung enthält als Elektrolyte mindestens Magnesium-Ionen (Mg^{2+}), Chlorid-Ionen (Cl^-) und Calcium-Ionen (Ca^{2+}) innerhalb eines physiologischen Konzentrationsbereichs. Vorzugsweise enthält die physiologische Elektrolytlösung eines oder mehrere der folgenden Ionen: Kalium-Ionen (K^+), Natrium-Ionen (Na^+), Sulfat-Ionen (SO_4^{2-})

und Phosphat-Ionen (PO_4^{3-}). Bei Zugabe von weiteren Bestandteilen, die unten stehend näher beschrieben werden, wird die positive Wirkung auf das Endothel-Gewebe weiter verstärkt. Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Endothel-protektiven Perfusionslösung lässt sich durch die Kombination von Albumin, den Salzen der Elektrolytlösung, insbesondere durch das Vorhandensein von Calcium (Ca^{2+}) und einem Nährstoffsubstrat erklären. Calcium ist zur Aufrechterhaltung der Funktion des Endothel-Gewebes notwendig, weil die Struktur von dessen Glykokalyx in Gegenwart von Ca^{2+} aufrechterhalten wird. Diese Struktur schafft das notwendige Mikromilieu auf der Endotheloberfläche, die für die physiologische Funktion und Aktivität vieler Endothel-Enzyme, Membrantransporter, Ionenkanäle und Rezeptoren wichtig ist.

Die zugesetzte Aminosäure Glutamin (L-Glutamin oder D-Glutamin) wird in der Grundzusammensetzung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung als Nährstoffsubstrat eingesetzt. Es dient daneben vor allem dem Zweck, dass sich speziell Endothelzellen, die ständig hochreaktive Sauerstoffmetabolite wie Wasserstoffperoxid, Sauerstoffradikale und Stichstoffmonoxid produzieren, auf noch nicht geklärte, aber eindeutig demonstrierbare Weise gegen diese Oxidantien besser schützen können, wenn Glutamin verfügbar ist.

Albumin ist ebenfalls ein essentieller Bestandteil der erfindungsgemäßen Perfusionslösung und u.a. für die Endothel-konservierende Wirkung der Lösung verantwortlich. So erniedrigt Albumin die an der Oberfläche des Endothels bei einer Durchspülung von (Blut)-Gefäßen herrschenden „Scherkräfte“ und die Oberflächenspannung, welche ansonsten eher eine Abkugelung statt Ausbreitung der Endothelzellen begünstigen würden. Beide physikalischen Größen (Kräfte) sind für eine mögliche Ablösung von Endothelzellen verantwortlich. Albumin wirkt daher in gewisser Weise in den Gefäßen wie das „Schmieröl“ in Maschinen. Die von den Chirurgen verwendeten sogenannten „kristalloide“ (= Protein-freie) Spüllösungen, wie physiologische Kochsalzlösung oder kardioplegische (weil stark Kalium-haltige) „Bretschneider-Lösung“, können diese hohen Scherkräfte und die Oberflächenspannung nicht in dem erforderlichen Maße verringern.

Eine Kombination von Nährstoffsubstrat (z.B. Glutamin) und Albumin zum Zwecke der Aufrechterhaltung des Endothels ist allein schon deshalb erforderlich, weil eine erhöhte Scherkraftbelastung des Endothels in Albumin-freier Lösung einen höheren Energieumsatz

und Energiebedarf des Endothels notwendig macht, da vermehrt Energie für das Festhalten der Endothelzellen an der Gefäßwand aufgewendet werden muss.

Weitergehende Untersuchungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zeigten, dass Plasmaderivate, die keine Gerinnungsfaktoren und agglutinierenden Faktoren, wie z.B. Agglutinine (z.B. agglutinierende Antikörper, Hämagglutinine, Lectine, Hämolysin, Phythämagglutinine), Komplementfaktoren, Entzündungsmediatoren oder Blutgruppen-spezifische Antikörper enthalten, für die Behandlung von isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen besonders bevorzugt sind. Die Anwesenheit solcher Faktoren in einer Perfusionslösung könnte zu unerwünschten Reaktionen mit und auf der Oberfläche von Endothelzellen der Gefäße führen. Denkbar wäre zum Beispiel die Anlagerung von Antikörpern an Antigene auf der Oberfläche von Endothelzellen, wodurch es zu einer Komplement-vermittelten Lyse dieser Zellen käme. Die Bildung von Immunkomplexen unter Komplementaktivierung kann jedoch auch zu einer Thrombose führen. Dies hätte wiederum eine frühere Einengung oder Verschluss des behandelten Gefäßes zur Folge, mit der Konsequenz, dass z.B. Gefäß- oder Organtransplantate ein weiteres Mal ersetzt werden müssen. Daher sind Serumpräparate bzw. –lösungen besonders bevorzugt, da hier die Gerinnungsfaktoren, welche die Blutgerinnungskaskade in Gang setzen könnten, im Wesentlichen nicht mehr vorhanden sind.

Auch Blutplasmapräparate sind als Endothel-protektive Perfusionslösungen zur Konservierung des Endothels in dem erfindungsgemäßen Endothel-protektiven Verfahren bzw. für die erfindungsgemäßen Verwendungen einsetzbar und besonders bevorzugt. Viele spezielle Proteine des normalen Blutplasmas erfüllen nämlich zusätzlich bestimmte Funktionen, welche sich günstig auf die Endothelfunktionen auswirken können: Transferrin und Ceruloplasmin wirken zum Beispiel als Transportproteine für Eisen- bzw. Kupferionen und Hormon-Transportproteine begünstigen wesentliche Enzymfunktionen am Endothel oder Signaltranduktionsprozesse in Endothelzellen. Auch Wachstumshormone sind ein wichtiger Bestandteil, welche die Zellteilungen als Voraussetzung der Reparatur und Abdeckung von Endothel-geschädigten Gefäßwänden begünstigen.

Solche Blutplasmapräparate zeigen gegenüber der zuvor genannten Grundlösung und deren besonderen Ausführungsformen eine noch gesteigerte Endothel-konservierende Wirkung, was vermutlich auf zusätzliche im Blutplasma vorhandene Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren,

zurückzuführen ist, welche sich günstig auf die Erhaltung des Endothel-Gewebes im Lumen der Gefäße auswirken. Blutplasma besteht natürlicherweise zu etwa 90% aus Wasser, etwa 8% Proteinen, wie Albumin (ca. 40 g/l), Globulin (α1-Globulin, α2-Globulin, β-Globulin, γ-Globulin), Transportvehikel wie Hormone und Bilirubin sowie Gerinnungsfaktoren.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren und in den erfindungsgemäßen Verwendungen sind solche Blutplasmapräparate bevorzugt, bei denen die zuvor genannten Faktoren, wie Gerinnungsfaktoren, agglutinierenden Faktoren, wie z.B. Agglutinine, Komplementfaktoren, Entzündungsmediatoren oder Blutgruppen-spezifische Antikörper nicht mehr vorhanden sind und die frei von toxischen Lipiden und Keimen, wie Viren oder Bakterien, sind.

In der Grundzusammensetzung der Perfusionslösung wird als Elektrolytlösung vorzugsweise eine den physiologischen anorganischen Salzbestandteilen des gesunden humanen Blutplasmas entsprechende Elektrolytlösung verwendet. In einer möglichen Ausführungsform der Erfindung wird der Bicarbonatanteil herkömmlicher Elektrolytlösungen durch äquimolares Histidinchlorid ersetzt.

Die erfindungsgemäße Elektrolytlösung umfasst die folgende Zusammensetzung: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM $MgSO_4$; 0,5-2 mM KH_2PO_4; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM $CaCl_2$. Eine bevorzugte Zusammensetzung der Elektrolytlösung umfasst: 140 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2,5 mM $CaCl_2$. Das Histidin-Cl kann auch durch 24 mM Bikarbonat ersetzt werden. Die Calcium-Konzentration in der Lösung kann in isotonischer Weise auf einen Wert von 0,01-0,1 mM herabgesetzt werden.

In atmosphärischer Luft beträgt der pH-Wert der Elektrolytlösung 7,2 bis 7,8 und wird vorzugsweise auf den Normalwert des arteriellen Blutes (pH = 7,4 +/- 0,04) eingestellt. Die Einstellung des pHs erfolgt vor der Zugabe von $CaCl_2$ als zuletzt zugesetzte Komponente der Lösung. Die Einstellung des pHs kann zum Beispiel durch einen Puffer erfolgen, der eine oder mehrere Säuren und/oder Basen enthält. Beispiele solcher Puffersubstanzen sind Lactat und/oder Bikarbonat.

Zur Energieerhaltung des endothelialen Stoffwechsels sind in der erfindungsgemäßen Perfusionslösung Energiesubstrate, vorzugsweise 2-10 mM Glukose und/oder 1-10 mM

Pyruvat, enthalten. Diese Energiesubstrate alleine ermöglichen eine ausreichende Bereitstellung von Stoffwechselenergie für das Endothel-Gewebe, selbst unter nahezu hypoxischen Bedingungen ($\rho O_2 \leq 10$ mm Hg). Bevorzugte Konzentrationen der Energiesubstrate sind 8 mM Glukose und/oder 2 mM Pyruvat. Die physiologische Elektrolytlösung enthält in einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung Heparin oder andere Antikoagulantien, wie Heparin, Heparinoide, Cumarin (Vitamin K-Antagonist), in einer gerinnungshemmenden Konzentration. Übliche gerinnungshemmende Konzentrationen für hochmolekulares Heparin sind 0,2-0,6 U/ml, vorzugsweise 0,4 U/ml im Falle von Humanblut. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung verwendet niedermolekulares Heparin, wie zum Beispiel das von Pharmacia Ltd. bereit gestellte Heparin, zu 100 µl/100 ml. Weiterhin können jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat als exogene Reduktionsmittel gegen reaktionsfreudige Sauerstoffverbindungen als Antioxidantien zugesetzt werden.

Eine Konzentration von bereits 0,1 Gew.-% nativem Albumin führt zu einer beträchtlichen Stabilisierung des Endothel-Gewebes. „Natives Albumin" bedeutet, dass das Albumin in seiner natürlichen (nativen) Form vorliegt und bevorzugt durch chromatographische Verfahren und nicht durch Anwendung von Hitze aufgereinigt worden ist. Bevorzugt ist natives Human-Albumin. Experimentell lässt sich die Wirkung von Albumin auf die Stabilisierung des Endothel-Gewebes mikroskopisch im Phasenkontrast und mittels Zeitrafferkinematographie ermitteln (siehe Beispiel 2). Dabei hat sich natives Albumin im Vergleich zu hitzebehandeltem Albumin als vorteilhaft herausgestellt. Natürliches Albumin kann beispielsweise in einem Konzentrationbereich von 10-50 g/l, vorzugsweise 30-45 g/l und am meisten bevorzugt bei etwa 40 g/l vorhanden sein.

Die Dichtigkeit des Endothelrasens kann durch Bestimmung der hydraulischen Konduktivität (Lp [cm/s/cm H_2O]) quantitativ gemessen werden. Im Vergleich zu den mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung behandelten Endothel-Schichten, verlieren die in Saline oder in „Bretschneider"-Lösung behandelten Endothel-Schichten ihre Dichtigkeit vollkommen, weil sich die Einzelzellen sehr schnell kugelig von der Oberfläche ablösen.

Eine weitere Ausführungsform der Endothel-protektiven Perfusionslösung der Erfindung enthält den Zusatz von homologem Hämolysin-freien oder autologem Serum an Stelle von

Albumin. In diesem Fall braucht kein zusätzliches natives Albumin zugesetzt werden, da dieses bereits im Serum vorhanden ist.

Eine über mehrere Tage nicht abnehmende Stabilisierung der nativen Dichtigkeit der Endothelzellen lässt sich erreichen, wenn der Elektrolytlösung homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum zugesetzt wird. Das Serum ist bevorzugt frei von Lipoprotein. Unverdünntes autologes Serum besitzt eine Albuminkonzentration von mindestens 6 Gew.-%, das entsprechend der erfindungsgemäßen Perfusionslösung auch bei stärkerer Verdünnung die Aufgaben des nativen Albumins übernehmen kann. Außerdem enthält humanes Serum zahlreiche Wachstumsfaktoren in wirksamen Konzentrationen (z.B. jeweils > 0,1 ng/ml bFGF, TGF, VEGF). Der Endothel-protektiven Perfusionslösung wird eine Konzentration von 1-10 Vol-% homologem Hämolysin-freien Serum oder autologem Serum zugesetzt. Vorzugsweise beträgt die Serumkonzentration 5-10 Vol-%. Schon bei einer Konzentaration von 1 Vol-% autologem oder homologem Hämolysin-freien Serum lässt sich eine erkennbare Verbesserung der Stabilisierung der Endothel-Dichtigkeit feststellen. Besondere Ausführungsformen der Erfindung haben eine Serum-Konzentration von 2,5 Vol-%, 5 Vol-% oder 10 Vol-% (Vol-% = Serumproteinanteil/l Lösung)

Das in der Endothel-protektiven Perfusionslösung enthaltene L-Glutamin kann in verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung eine Konzentration von 2,5 mM, 5 mM oder 7,5 mM haben, wobei eine Konzentration von 2,5 mM L-Glutamin bevorzugt ist.

Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Endothel-protektive Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika in bakteriziden Konzentrationen. Bevorzugt sind zum Beispiel 100-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin, wobei 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin am meisten bevorzugt sind.

Eine bevorzugte Perfusionslösung, die zur Endothelkonservierung und Endothel-Erneuerung eingesetzt werden kann hat folgende Zusammensetzung: Physiologische (isotonische) Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Ein weitere sehr wirksame und in den Beispielen getestete Lösung für den Einsatz in den erfindungsgemäßen Verfahren oder für die erfindungsgemäße Verwendung hat die folgende Zusammensetzung:

127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$, 10 Vol-% Lipoprotein-freies, Hämolysin-freies, homologes Serumpräparat aus einem Pool von Blutpräparaten, 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Daneben kann zu der erfindungsgemäßen Perfusionslösung eine wirksame Menge einer oder mehrerer Flavonoid-Verbindungen (bzw. Derivate davon) zugesetzt werden, was mikrozirkulatorische Komplikationen (z.B. Endothelläsionen), welche durch Freisetzungsprodukte von simultan aktivierten Granulozyten oder Thrombozyten verursacht werden, in den Gefäßlumen verhindern. Bevorzugte und in dem erfindungsgemäßen Verfahren getestete Flavonoide sind Quercetin (etwa 50-250 µM) und Rutosiverbindungen, insbesondere Trihydroxyethyl-Rutosid (etwa 50-250 µM) in wirksamen Konzentrationen.

Eine besonders bevorzugte Lösung für die Endothelerhaltung und für die Regenerierung der Endothel-Schicht bei mikrozirkulatorische Komplikationen hat die folgende Zusammensetzung: Isotonische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich 100 µM frisch zugesetztes Quercetin. Statt Quercetin kann auch 100 µM Trihydroxyethyl-Rutosid zugesetzt werden.

In der chirugischen Praxis wäre es wünschenswert, auch die Spasmenbildung von Gefäßen zu verhindern bzw. zumindest zu verringern. Dies kann durch Zusatz von wirksamen Mengen von Vasodilatoren wie Papaverin oder Adenosin bewirkt werden. Bevorzugt sind 50-200 µM Papaverin. Eine Konzentration von 100 µM Papaverin ist besonders bevorzugt. Adenosin

wird bevorzugt in Konzentration von 0,5 bis 2 mM zugesetzt, wobei 1 mM besonders bevorzugt ist.

Eine besonders bevorzugte und in den erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen eingesetzte Lösung hat folgende Zusammensetzung: 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich 100µM Papaverin (oder 1 mM Adenosin).

Speziell in der kardiochirugischen Praxis, z.B. bei Herztransplantationen, wäre es auch wünschenswert, das Herz während der Entnahme und bei der Inkubation in der erfindungsgemäßen Perfusionslösung ruhig zu stellen, so dass die Kontraktionen des Herzens aufhören. Dies kann durch erhöhte Kalium-Konzentrationen in der Perfusionslösung erreicht werden. Eine solche Lösung nennt man auch kardioplegische Lösung, da sie die elektrische Aktivität des Herzens hemmt und damit die Kontraktion verhindert. Dabei ist zu beachten, dass kardioplegische Lösungen möglichst isotonisch sind, d.h. sie sollten die selben molekularen Konzentrationen aufweisen, um Schäden der Gefäßwände oder die Funktionalität des Organs zu vermeiden. Bereits bei Kalium-Konzentration von mehr als 6 mM stellt man eine Abnahme der Kontraktion des Herzens fest. Bei einer Konzentration von 8 mM tritt eine nahezu vollständige Lähmung des Herzens ein. Diese Ruhigstellung des Organs ermöglicht eine leichte Handhabung durch den Chirugen während der Einpflanzung.

Die fertige Lösung kann ohne Wirkungsverlust monatelang bei einer Temperatur von 4 °C und in völliger Dunkelheit gelagert werden. Eine Sterilisation zur Freihaltung von Keimen in der Lösung kann zum Beispiel über Sterilfilter erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform kann in dem Endothel-protektiven Verfahren zur Behandlung von isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen der vorliegenden Erfindung ein Blutplasmapräparat verwendet werden. Überraschenderweise wurde von den Erfindern gefunden, dass die einer solchen Serum-artigen-Lösung (Blutplasmapräparat) zukommenden inhibitorischen und modulierenden Eigenschaften offensichtlich für den Erhalt der Endothel-Zell-Integrität förderlich sind. Im Vergleich zur Grundzusammensetzung der

Endothel-protektiven Perfusionslösung, die eine physiologische Elektrolytlösung, ein Nährstoffsubstrat und Albumin enthält und die bereits eine gute Endothelerhatlung zeigt (siehe Beispiele), kann die Wirksamkeit auf die Konservierung und Erhaltung des Endothels in Hohlorganen durch Verwendung eines homologen anti-koagulierten Blutplasmapräparats anstelle des Albumins, weiter gesteigert werden. Bevorzugt ist daher eine Perfusionslösung, bei der das native Albumin in der Grundzusammensetzung der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch ein anti-koaguliertes Blutplasmapräparat ersetzt wird, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind. Solche instabilen Faktoren sind z.B. Lipoproteine und andere toxische Lipide.

Dabei ist wegen der Aufrechterhaltung der physiologischen Calcium-Konzentration heparinisiertes (d.h. mit Heparin behandeltes) Blutplasma bevorzugt.

Unter einem Blutplasmapräparat wird eine Blutplasmalösung verstanden, die aus dem Blutplasma von isoliertem Vollblut hergestellt worden ist und eine isotone 5 Vol-% Lösung humaner Serumproteine darstellt. Als Vollblut kommt bevorzugt das Blut von Säugetieren in Betracht, insbesondere humanes Vollblut von gesunden Spendern (z.B. ein Pool von gesunden 1000 Spendern). Ein Blutplasmapräparat enthält neben Wasser (ca. 90%), anorganische Elektrolyte (z.B. Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium-, Chlorid-Ionen) auch Nährstoffsubstrate wie Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren und natives Albumin ist daher im Sinne der vorliegenden Erfindung verwendbar. Außerdem enthält das Plasma viele wichtige Transportproteine (z.B. Transferrin, Coeruloplasmin etc.). Ein solches Blutplasmapräparat ist bevorzugt ein nicht-agglutinierendes und anti-koaguliertes Blutplasmapräparat, bei dem die Blutgerinnung durch Zugabe von Blutgerinnungs-hemmenden Substanzen gehemmt wird bzw. gar keine oder nur wenige Gerinnungsfaktoren noch vorhanden sind. Solche anti-koagulatorisch wirksame Substanzen sind beispielsweise Antithrombin III, zusammen mit Heparin und Heparinoide. Auch mit Oxalsäure, EDTA oder Citrat und freien Ca-Ionen befreite Blutplasmapräparate sind für eine Verwendung bei der Endothel-Erhaltung in isolierten Organen oder Gefäßen im Sinne der Erfindung umfasst.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem isolierte Hohlorgane und biologische Gefäße für Transplantationszwecke mit der Endothel-protektiven Perfusionslösung behandelt werden,

sind außerdem solche Blutplasmapräparate bevorzugt, bei denen instabile Komponenten, wie toxische Lipide oder Lipoprotein, sowie eine Immunreaktion auslösende Faktoren (z.B. Blutgruppen-spezifische Antikörper) und Keime, wie Viren und Bakterien, durch entsprechende Maßnahmen, die auf dem Gebiet bekannt sind, entfernt worden sind.

Ein typisches erfindungsgemäß eingesetztes Blutplasmapräparat umfasst bevorzugt die folgendenden ionischen Bestandteile:

Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa 50-200 mM Chlorid-Ionen. Besonders bevorzugt sind ungefähr 150 mM Natrium-Ionen, ungefähr 4 mM Kalium-Ionen, ungefähr 2 mM Calcium-Ionen, ungefähr 1 mM Magnesium-Ionen, ungefähr 110 mM Chlorid-Ionen.

Weiter umfasst ein solches Blutplasmapräparat natürliches Albumin, z.B. in Konzentrationsbereichen von etwa 25-45 g/l, üblicherweise etwa 30-40 g/l, am meisten bevorzugt etwa 32 g/l.

Daneben enthält das Blutplasmapräparat üblicherweise Immunglobuline, wobei der Gehalt an Immunglobulin G etwa 3-15 g/l, IgA 1-10 g/l, und IgM etwa 0,2-3 g/l sein kann. Vorzugsweise enthält das Blutplasmapräparat etwa 7 g/l IgG, 1,7 g/l IgA und etwa 0,5 g/l IgM.

Der pH-Wert des Blutplasmapräparats entspricht etwa 7,3-7,8 und ist vorzugsweise 7,4. Bevorzugt hat die Blutplasmalösung eine Osmolarität von 200-350 mosmol/kg, bevorzugt etwa 288 mosmol/kg.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäß eingesetzten Blutplasmapräparats umfasst die folgende Zusammensetzung: 150 mM Natrium-Ionen, 3,65 mM Kalium-Ionen, 1,97 mM Calcium-Ionen, 1 mM Magnesium-Ionen, 107 mM Chlorid-Ionen, 32 g/l Albumin, Immunglobuline IgG 7 g/l, IgA 1,7 g/l, und IgM 0,5g/l und 51 g/l Gesamt-Protein und natürliche im Blutplasma enthaltende Nährstoff- und Energielieferanten.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des Blutplasmapräparats ist eine isotonische 5%-ige Lösung humaner Serumproteine, hergestellt aus dem Plasma von gesunden Spendern.

Das Präparat enthält vollständige und biologisch intakte Immunglobuline in stabiler Form, Albumin und Transport- und Inhibitorproteine im natürlichen Konzentrationsverhältnis. Zur Gewährleistung einer guten Lagerstabilität ist das Präparat bevorzugt Lipoprotein-frei, Hämolysin-frei und frei von Gerinnungsfaktoren. Eine bevorzugte Ausführungsform eines solchen Präparates umfasst die folgende Zusammensetzung: Etwa 3,65 g/l Natrium-Ionen, 0,16 g/l Kalium-Ionen, 0,08 g/l Calcium-Ionen, 0,02 g/l Magnesium-Ionen, 3,65 g/l Chlorid-Ionen, 50 g/l humane Serumproteine, davon ca. 31 g/l Albumin, ca. 10 g/l Immunglobuline des Menschen mit IgG ca. 7,1 g/l, IgA ca. 1,55 g/l, und IgM ca. 0,48 g/l und Wasser. Die Isoagglutinintiter der Lösung (Anti-A und Anti-B) betragen bevorzugt <= 1:64.

Für das erfindungsgemäße Verfahren oder die erfindungsgemäßen Verwendungen ist das Blutplasmapräparat als Perfusionslösung Pyrogen-frei und wurde durch Viren- und/oder Bakterien-inaktivierende Maßnahmen (Behandlung mit β-Propiolacton und UV-Licht, Erwärmung auf 37°C) behandelt.

Bevorzugt zeigt die Blutplasmalösung keine anti-komplementäre, koagulatorische oder agglutinierende Aktivität mehr.

Die Verwendung eines anti-koagulierten Blutplasmapräparats anstelle des zugesetzten Albumins in der Grundzusammensetzung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung zeigt eine hervorragende Endothel-konservierende Wirksamkeit, die im Vergleich zur Grundzusammensetzung sogar nochmals gesteigert ist. Dies ist vermutlich auf die weiter im Plasma vorhandenen Serumproteine zurückzuführen, welche u.a. bei dem Stofftransport eine wichtige Rolle spielen.

Im folgenden wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Endothel-konservierenden Perfusionslösung auf Grundlage eines Blutplasmapräparats beschrieben:

Das Verfahren umfasst die Bereitstellung von Blutplasma (z.B. von einem Säugetier wie Pferd oder Rind, bevorzugt vom Menschen). Das humane Blutplasma kann von mehreren verschiedenen Spendern stammen und wird als Mischpräparat gesammelt (Plasma-Pool). Das Kryopräzipitat wird vorzugsweise unter Verwendung von Zentrifugation bei einer Temperatur von etwa 5°C von den flüssigen Blutplasmabestandteilen abgetrennt. Als ein Bestandteil der

Virusinaktivierung wird das verbleibende Blutplasmas mit β-Propiolacton behandelt, d.h. β-Propiolacton wird in flüssiger Form dem Blutplasma-Pool zugegeben. Zur weiteren Virusinaktivierung wird das mit β-Propiolacton behandelte Plasma mit Hilfe einer UV-Bestrahlungsapparatur mit ultraviolettem (UV)-Licht behandelt. Anschließend werden gerinnungsaktive (d.h. koagulatorische) Proteine durch Anionen-Austauschchromatographie, z.B. unter Hinzunahme einer DEAE Sephadex-Säule, abgetrennt. Im weiteren kann eine Tiefen- und Sterilfiltration erfolgen, was eine Lagerung der Plasmaproteinlösung über einen längeren Zeitraum (mehr als 21 Tage) bei einer Temperatur von 22°C ermöglicht. Eine nachfolgende Behandlung mit Aerosil® bewirkt die Adsorption lagerstabiler Proteine und Lipide. Diese Behandlung führt auch zum Entfernen von möglicherweise noch vorhandenen Viren. Es folgt eine Dia- und Ultrafiltration, was die Einstellung der Proteinlösung ermöglicht. Auf dieser Stufe erfolgt die Einstellung des pH-Wertes und eine Sterilfiltration, was eine Lagerung des Zwischenprodukts für etwa 30 Tage bei einer Temperatur von 37° C möglich macht. Mehrere Zwischenprodukte von dieser Stufe können miteinander kombiniert („gepoolt") werden, um so zu dem endgültigen Blutplasmapräparat zu gelangen. Dieses Blutplasmapräparat ist pyrogenfrei und virenfrei und kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen bzw. für die genannten Verwendungen, d.h. zur Behandlung oder Konservierung von Organen oder Gefäßen für die Vorbereitung als Organ- oder Gefäßtransplantate oder zur Reparatur von Verletzungen des Endothel-Gewebes, eingesetzt werden.

Der Fachmann wird erkennen, dass in den oben genannten Verfahren und Verwendungen, die Perfusionslösungen bzw. Inkubationslösungen in modifizierten Formen verwendet werden können. So kann sich die Perfusionslösung in ihrer Salz- und Protein-Zusammensetzung unterscheiden. Auch Lösungen, die entweder natürlich vorkommende oder künstlich zugesetzte Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren (RNA, DNA), Peptide wie z.B. Gelatinepräparate, Hormone und Pflanzenstoffe wie z.B. Dextrane, Liposomen zur Übertragung lipophiler Wirkstoffe, Hormone oder Nährstoffe enthalten, um die Wirkung der Perfusionslösung zu verstärken oder zu spezifizieren, sind in den erfindungsgemäßen Verfahren oder für die genannten Verwendungen der Perfusionslösung einsetzbar, solange sie die oben genannten Grundbestandteile enthalten, welche die Endothel-konservierende Wirkung ausmachen.

Modifizierte Lösungen der erfindungsgemäßen Perfusionslösungen können auch Wachstumsfaktoren oder andere proliferationsfördernde Substanzen in wirksamen Konzentrationen enthalten, welche für die Erhaltung und/oder für die Proliferation des Endothel-Gewebes nützlich sind, indem sie die Teilung der Endothelzellen anregen oder den Gewebezusammenhalt von Endothelzellen untereinander fördern. Wie in den Beispielen gezeigt, verringern die Wachstumsfaktoren oder Wachstumshormone (wie z.B. Hydrocortison oder gleichwirkende Faktoren) auch die Generationszeit der Zellteilung, was für eine schnelle Erholung des Endothelrasens förderlich ist. Die Erholung des Endothels bzw. das Anregen der Teilung von Endothelzellen in einem verletzten Endothel-Gewebe (Läsionen) eines biologischen Gefäßes oder Hohlorgans ist daher ein Anwendungsbereich, bei dem Wachstumsfaktoren oder –hormone in der Endothel-protektiven Lösung zum Einsatz kommen können.

Beispiele solcher Wachstumsfaktoren sind der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF), vaskuläre Endothel-Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF1, VEGF, VEGF3), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und Stammzell-Faktor (SCF) oder gleichwirkende Faktoren. Weitere einsetzbare Wachstumsfaktoren schließen VEGF121, VEGF165, VEGF189, bFGF, PlGF, PDGF, GM-CSF und G-CSF oder gleichwirkende Faktoren ein.

Solche Wachstumsfaktoren fördern die spezifische Erhaltung oder Proliferation des Endothel-Gewebes in Gefäßen, indem sie an spezifische Oberflächenrezeptoren dieses Gewebes binden um dadurch Signaltransduktionsmechanismen in Gang zu bringen, die als Folge die Expression von wachstumsfördernden Genen oder Gen-Gruppen bewirkt. Die Gen-Produkte können wiederum in einem komplizierten Zusammenspiel die Teilung der Endothelzellen bewirken.

Eine besonders bevorzugte Wachstumsfaktoren enthaltende und erfindungsgemäß eingesetzte Lösung hat folgende Zusammensetzung:

Isotonische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.:

100 µl/100 ml fertige Lösung), 0,1-1 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 0,2-2 ng/ml basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und Hydrocortison 0,2-3 µg/ml.

Der Fachmann wird erkennen, das solche und andere Modifikationen die Endothel-konservierende Wirkung der Perfusionslösung auf das Endothel von Gefäßen steigern können. Darunter fallen zum Beispiel insbesondere Faktoren, welche die Glykokalyx der Endothelzellen (d.h. eine Proteoglykan- und Glykoprotein-reiche, Gel-artige Schicht, die an Oberflächenproteine und Phospholipiden im äußeren Blatt der Zellmembran gekoppelt ist) so erhalten oder modifizieren, dass die Gewebearchitektur oder -struktur des Zellverbandes, n der Zellfugen, erhalten bleibt oder sogar verbessert wird. Auch der Zusatz eines oder mehrerer Cytokine (z.B. TNF, TGF, IFN) oder pflanzlicher Wirkstoffe, wie Berberin (isoliert aus *Berberis airistata*), zu der Perfusionslösung kann nützlich sein, um die Endothelzellschicht zu erhalten oder zu regenerieren, um so einer frühen Thrombosierung vorzubeugen oder um sie zu verhindern.

Weiterhin können Endothelzell-spezifische Faktoren zugesetzt werden, welche die Expression von Genen, welche für Zelloberflächen-Rezeptoren kodieren, stimulieren. Beispiele solcher Rezeptoren sind CD34, CD133, KDR (VEGFR-2), VE-Cadherin, E-Selektin, $\alpha_v\beta_3$, Endothel-Vorläuferzellen spezifische Lektine oder andere Rezeptoren, die spezifisch für Endothelzellen und/oder Endothel-Vorläuferzellen sind.

Der Fachmann wird auch erkennen, dass solche Verbindungen oder Faktoren der Grundlösung der Endothel-protektiven Perfusionslösung zugesetzt werden können, welche die Ausbreitung und Vermehrung von Endothelzellen bzw. Endothel-Vorläuferzellen fördern. Solche Substanzen sind zum Beispiel Fibrin, Fibronektin, Laminin, Gelatine oder Kollagen zur Förderung der wandständigen Verankerung der Endothelzellen oder Purin- und Pyrimidinverbindungen wie Adenosin, Inosin, Hypoxanthin oder Thymidin, Uridin und Cytosin zur Förderung des Energie- und Nukleinsäure-Stoffwechsels und der Signaltransmission von Endothelzellen.

Auch bestimmte Medikamente und Nahrungszusätze können die Endothelfunktionen und die Abdichtung des Endothels fördern. Eine ganze Reihe von Flavonoidverbindungen wie z.B. Quercetin, Rutosiverbindungen oder deren Glykoside (z.B. Quercetin-Glucuronat) fördern, wie in den Beispielen gezeigt, die Dichtigkeit der interendothelialen Zellfugen, indem sie den

kontraktilen Apparat der Endothelzellen stark relaxieren. Antioxidativ wirkende Substanzen wie Harnsäure, Vitamin E oder Flavonoide schützen das Endothel gegen den Einfluss von Oxidantien. Vasodilatorische Wirkstoffe wie Adenosin oder Papaverin können die glatte Gefäßmuskulatur entspannen und Spasmen verhindern, die unter Umständen durch extreme Faltung des Endothels auch dieses Gewebe schädigen können. Dabei wird z.B. die Gefäßmuskulatur der Bypass-Gefäße relaxiert und Gefäßspasmen vermieden, die man sonst nur durch Anwendung hoher intravaskulärer Dehnungsdrucke durchbrechen könnte mit der Folge von massiven Endothelläsionen.

Abwandlungen der erfindungsgemäßen Endothel-konservierenden Perfusionslösung schließen Fresh-Frozen-Plasma ein. Dieses entspricht menschlichem Blutplasma, das bei oder unterhalb einer Temperatur von –18 °C innerhalb weniger Stunden tiefgefrorenen wurde. Das Fresh-Frozen-Plasma enthält Plasma-Protein (wie das notwendige Albumin), Koagulationsfaktoren, Von Willebrand´s Faktor und Kolloide. Das Fresh-Frozen-Plasma enthält aber keine Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

Um eine frühe Thrombose des Gefäßes zu verhindern oder vorzubeugen, sollten eine Antikoagulation des Fresh-Frozen-Plasmas vermieden werden (z.B. durch Zugabe von Antikoagulantien, wie Heparin, Citrat, EDTA etc.).

Es sollte daher darauf geachtet werden, dass die Perfusionslösung keine Isoagglutinine, Komplement- und Gerinnungsfaktoren enthält, die zur Schädigung des Gefäßendothels führen könnten, wenn die Blutgruppen zwischen Spender und Empfängerendothel nicht identisch sind. Es ist zu bedenken, dass Endothelzellen die selben Blutgruppenmerkmale wie Erythrozyten aufweisen, also gegen Falschplasma mit Isoagglutininen (= gegen Blutgruppen gerichtete Antikörper) reagieren.

Weitere Abwandlungen der erfindungsgemäß eingesetzten Perfusionslösung schließen z.B. Plasmaexpanderlösungen (Gelatine- oder Dextran-enthaltend) oder modifizierte Humanalbuminpräparate ein, die mit zusätzlichen Nähr- und Energiesubstraten angereichert worden sind.

Es soll an dieser Stelle nochmals ausdrücklich betont werden, dass die Erfindung auch sämtliche Kombinationen der hier beschriebenen Lösungsbestandteile und Zusätze umfasst.

Keinesfalls soll die Erfindung auf eine bestimmte Ausführungsform limitiert sein. Der Fachmann erkennt, dass die Kombination von einzelnen hier beschriebenen Bestandteilen mit ihren einzelnen Wirkungen im Sinne der Endothel-Erhaltung und –konservierung von Gefäßen und Organen möglich ist. Der Fachmann wird die weiteren Bestandteile der Perfusionslösung und deren Konzentrationen je nach Verwendung und Art des Hohlorgans auswählen, wobei in allen hier beschriebenen Lösungen die Grundkomponenten physiologische oder isotonische Elektrolytlösung, Nährstoffsubstrat und vor allem Albumin enthalten sind. Der Fachmann wird auch erkennen, dass die hier beschriebenen Bestandteile auch durch gleichwirkende Faktoren oder Substanzen ausgetauscht werden können, um die jeweilige Wirkung zu erzielen (z.B. gleichwirkende Wachstumsfaktoren zu EGF oder bFGF).

Der Fachmann wird weiter erkennen, dass auch Kombinationen der einzelnen hier beschriebenen Lösungen, als Abwandlungen der erfindungsgemäß eingesetzten Perfusionslösung umfasst sind.

Die erfindungsgemäße Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen umfasst gemäß Figur 1 eine Kammer (1), einen axial beweglichen Stempel (6), eine Kanüle (5), einen Vorratsbehälter (7), der eine Endothel-konservierende Perfusionsflüssigkeit enthält und eine Dichtungsvorrichtung (3), wobei die Kanüle mit dem axial beweglichen Stempel (6) verbunden ist, so dass diese mit dem Stempel in die Kammer bewegt werden kann und wobei die Dichtungsvorrichtung (3) ein Ende des biologischen Gefäßes umschließen kann und die Kanüle mit dem anderen Ende des Gefäßes verbunden werden kann, so dass die Endothel-protektive Perfusionslösung aus dem Vorratsbehälter (7) selektiv, vorzugsweise unter einem Druckgradienten, in das biologische Gefäß geleitet werden kann.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Apparatur der Erfindung umfasst die Dichtungsvorrichtung verformbare Dichtungsscheiben, die stapelförmig unter einer Rändelschraube angeordnet sind.

Vorzugsweise sind die stapelförmig in der Rändelschraube angeordneten Dichtungsscheiben anpressbar und durch perforierte Zwischenscheiben, zum Beispiel durch Stahlscheiben, getrennt. Die Stahlscheiben haben vorzugsweise eine Dicke von 0,5–2 mm. Die gestapelten Dichtungsscheiben sollen durch die perforierten Stahlscheiben auf Abstand gehalten werden.

Vorzugsweise soll der Durchmesser der Zwischenscheibenöffnungen 1-2 mm kleiner sein als der Durchmesser der jeweils ausgewählten Dichtungsscheiben.

Vorzugsweise haben die Dichtungsscheiben einen Durchmesser, der an die Größe des abzudichtenden Gefäßes angepasst ist. Der Durchmesser des Gefäßes ist dabei größer als der Durchmesser der Dichtungsscheiben, so dass die Gefäße im Durchtrittsbereich der Dichtungsscheiben von diesen eng umschlossen werden, wobei aber das Lumen der unter Druck gefüllten und dadurch geweiteten Gefäße nicht verschlossen wird.

Der Durchmesser der Dichtungsscheiben kann an den Außendurchmesser des Gefäßes durch Zusammenpressen der verformbaren Dichtungsscheiben angepasst werden. Im Fall von Blutgefäßen beträgt der Durchmesser der Dichtungsscheiben vorzugsweise 1-10 mm und/oder haben eine Dicke von 0,3-3 mm. Bei Hohlorganen entsprechen die Gefäße den zuleitenden Arterien bzw. den abführenden Venen des Organgefäßsystems in dem jeweiligen Hohlorgan. Bevorzugtes Material der Dichtungsscheiben ist Silikon oder jedes andere zu Abdichtung verwendbare und verformbare Material. Die perforierten Stahlscheiben bestehen bevorzugt aus Stahl, zum Beispiel V2A-Stahl.

Eine bevorzugte und in Figur 1 gezeigte Ausführungsform der Apparatur der Erfindung enthält eine Kammer (1) und Silikon-Dichtungsscheiben (3) mit einer zentralen Perforation, die in einer Rändelschraube angeordnet sind. Die Kammer ist bevorzugt zylinderförmig. Durch die Perforation in den Dichtungsscheiben wird das eine Ende eines Blutgefäßes (1) (z.B. Arterie oder Vene) zunächst nur ein kurzes Stück hindurchgezogen und mit einer Klemme verschlossen. Da andere Ende des Gefäßes wird mit der Kanüle (5) des Stempelteiles verbunden. Die Kanüle ist vorzugsweise mit einem Schlauch verbunden, der wiederum mit dem Vorratsbehälter (7) verbunden ist. Der Vorratsbehälter enthält die erfindungsgemäße Endothel-protektive Perfusionslösung und kann zum Beispiel eine Boyle Mariott'sche Flasche sein.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird mit Hilfe eines zwischen dem Vorratsbehälter und der Kammer bestehenden Druckgradienten (Δp) die Perfusionslösung bei einem definierten und konstanten Druck aus dem Vorratsbehälter in die Kanüle und damit in das Blutgefäß geleitet. Der einfachste Fall zur Erzeugung eines natürlichen Druckgradienten ist ein hydrostatischer Höhenunterschied, zum Beispiel durch die

Positionierung der Vorratsflasche in ca. 1,30 m Höhe oberhalb der Kammer. Anschließend wird der axial bewegliche Stempel (6) mit dem vorgeschalteten Blutgefäß abgedichtet in den Innenraum der Kammer eingeschoben.

Wird nun unter mäßigem Druck die Endothel-protektive Perfusionslösung in das Gefäß appliziert, kann es zum Ausströmen der Perfusionsflüssigkeit über die Seitenäste des Gefäßes kommen. Das Ausspritzen von Flüssigkeit aus den Seitenästen des Gefäßes im Kammerinnenraum nimmt aufgrund des dort sich aufbauenden Gegendruckes rasch ab. Durch weiteres Eindrehen der Rändelschraube im Dichtungsbereich gelingt es weitgehend, den Zylinderinnenraum im Ausführungsbereich des Gefäßes abzudichten, so dass das Ausströmen über die in diesem Bereich liegenden Seitenäste bald unterbleibt. Zieht man nun das Blutgefäß vorsichtig abgedichtet nach vorne weiter durch die Perforation der Dichtungsscheiben, kommt es zum selektiven Ausspritzen von Perfusionslösung aus allen neu heraustretenden Seitenästen (8), die dann jeweils sofort mit Ligationshilfen (9) ligiert werden können. So lässt sich diese chirurgisch unabdingbare Dichtigkeitsprüfung von biologischen Gefäßen, vor allem solche die für einen arteriellen Bypass vorgesehen sind, sehr schonend für das Endothel und bei einem definierten und konstanten Druck abwickeln. Außerdem lässt sich sehr sauber arbeiten, d.h. Überschwemmungen wie bei der oben beschriebenen Verwendung von Saline, unterbleiben. Schließlich wird das Gefäß ganz aus dem Gefäß herausgezogen und durch Anwendung eines Perfusionsdruckes (z.B. 250 mm Hg) noch einmal in seiner ganzen Länge auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend kann es bis zur Transplantation, vorzugsweise bei einer Temperatur von 37° C, in die protektiven Perfusionslösung eingelegt werden.

In einer weiteren Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Perfusionsflüssigkeit zusätzlich über eine Durchlaufspirale eines Thermostatisierungssystems geleitet, so dass die Perfusionsflüssigkeit vorzugsweise auf eine Temperatur von 37°C erwärmt werden kann.

Die Apparatur kann zusätzlich eine oder mehrere Entlüfterschrauben enthalten, die an der Kammer angebracht sind und zur Entlüftung bzw. Entleeren des Kammerinhalts dienen.

Die erfindungsgemäße Apparatur eignet sich für sämtliche biologische Gefäße, wie z.B. Blutgefäße, also Arterien und Venen, oder Lymphgefäße. Eine Anwendung der Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von Blutgefäßen insbesondere in Hinblick auf die

Bereitstellung von Gefäßen für die Gefäßtransplantation bzw. Bypass-Operation ist hierbei bevorzugt.

Die erfindungsgemäße Apparatur ermöglicht in vorteilhafter Weise einen konstanten Druckgradienten über die Gefäßwand, was ein Kollabieren des Gefäßes mit einhergehender Zerstörung des Endothel-Gewebes verhindert.

Mit Hilfe der Rändelschraube und den darin enthaltenen Dichtungsscheiben kann der Anpressdruck auf das Gefäßsegment variiert werden und so die Dichtigkeit reguliert werden.

Der Stempel bewegt sich vorzugsweise axial, d.h. durch die Kammer in Richtung der Dichtungsvorrichtung.

Neben den oben erwähnten Vorteilen ermöglicht die erfindungsgemäße Apparatur eine genaue und gleichmäßige Behandlung des Gefäßes mit der erfindungsgemäßen Perfusionsflüssigkeit. So ermöglicht die Apparatur eine gleichmäßige Versorgung der Endothelzellen mit Perfusionsflüssigkeit. Dies ermöglicht den Austausch von biologisch wichtigen Stoffwechselmolekülen die zum Erhalt bzw. für die Proliferation der Endothelzellen notwendig sind.

Die Apparatur eignet sich besonders zur Dichtigkeitsprüfung von biologischen Gefäßen. Hierbei wird ein Gefäßsegment über die Dichtungsscheiben herausgezogen und Stück für Stück auf Dichtigkeit überprüft. Die dabei festgestellten Gefäßabgänge können dann mit geeigneten Ligationshilfen, wie z.B. Klemmen oder Micro-Clips, ligiert werden. Erfindungsgemäß werden auch kleinste Seitenäste über aussprizende Perfusionsflüssigkeit leicht entdeckt und können unter Druckkontrolle effizient ligiert werden. Schließlich kann auch das vollständig aus der Apparatur heraus gezogene Gefäß noch einmal in seiner Gesamtheit auf Dichtigkeit bei einem adäquaten Druck überprüft werden (Δp mindestens.180 mm Hg).

Die erfindungsgemäße Perfusionslösung kann daher in einem Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen eingesetzt werden. Hierbei werden die Hohlorgane bzw. biologischen Gefäße mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung In-Kontakt gebracht. Das In-Kontakt-Bringen kann das Durchspülen, das

Einlegen, oder das vollständige oder partielle Behandeln des Hohlorgans oder Gefäßes mit der Perfusionslösung umfassen.

Das Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen umfasst bevorzugt die Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur, mit der die Perfusionsflüssigkeit durch das Hohlorgan geleitet wird.

Die nachfolgenden Figuren dienen der Erläuterung der Erfindung.

ZEICHNUNGEN

Figur 1 zeigt eine Apparatur zur Verwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen.

Figur 2 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit Saline.

Figur 3 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit einer Grundzusammensetzung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung.

Figur 4 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung.

Figur 5 zeigt kultivierte venuläre Endothelzellen unter der Einwirkung von Freisetzungsprodukten aus Bluttplättchen und Granulozyten mit anschließender Behandlung einer erfindungsgemäßen Perfusionslösung, die Quercetin enthält.

Figur 6 zeigt kultivierte venuläre Endothelzellen unter der Einwirkung von Freisetzungsprodukten aus Bluttplättchen und Granulozyten mit anschließender Behandlung einer erfindungsgemäßen Perfusionslösung, die Papaverin enthält.

Figur 7 zeigt die Reaktion gezüchteter kultivierter venulärer Endothelzellen aus der humanen *Vena saphena* auf kardioplegische Kalium-Konzentrationen.

Figur 8 zeigt die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und die Wirkung auf die Endothelabeckung in der *Vena saphena* bei Behandlung mit isotonischer Kochsalzlösung.

Figur 9 zeigt die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und die Wirkung auf die Endothelabeckung in der *Vena saphena* bei Behandlung mit Bretschneider-Lösung.

Figur 10 zeigt die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und die Wirkung auf die Endothelabeckung in der *Vena saphena* bei Behandlung mit einer 5%-igen Albuminlösung als Perfusionslösung.

Figur 11 zeigt die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und die Wirkung auf die Endothelabeckung in der *Vena saphena* bei Behandlung mit einem Blutplasmapräparat als Perfusionslösung.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung, sollen jedoch nicht als beschränkend aufgefasst werden.

BEISPIELE

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung und der Illustration der Erfindung. Sie sollen in keinem Fall limitierend aufgefasst werden. Insbesondere wird der Fachmann erkennen, dass die Beispiele im Sinne der Beschreibung beliebig erweiterbar sind und den Grundgedanken der Erfindung wiederspiegeln.

Beispiel 1: Bevorzugtes Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde bei Verwendung von Blutgefäßen eine Perfusionslösung mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Physiologische Elektrolytlösung mit 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$. Vor Zugabe von $CaCl_2$ wurde der pH-Wert der Lösung bei atmosphärischen Luftbedingungen auf pH=7,40 eingestellt. Weiterhin enthielt die Perfusionslösung 10 Vol-% Lipoprotein-freies, Hämolysin-freies, homologes Serumpräparat

aus einem Pool von Blutpräparaten (von gesunden Spendern), 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Bei dem Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung des isolierten biologischen Gefäßes wurde eine Apparatur eingesetzt, welche die Seitenäste des zur Bypass-Prothese gedachten Gefäßes zuverlässig ligieren sollte. Die Apparatur entspricht im Wesentlichen die der Figur 1. Diese besteht aus einer Kammer (1) und Silikon-Dichtungsscheiben mit dazwischengelagerten Stahlscheiben aus V2A-Stahl (3), welche mit ihren zentralen Perforationen axial in einer Rändelschraube angeordnet sind. Durch diese Dichtungsvorrichtung wurde das eine Ende einer menschlichen *Vena saphena* zunächst nur ein kurzes Stück hindurchgezogen und mit einer Klemme verschlossen. Das andere Ende des Gefäßes wurde mit der Kanüle (5) des Stempelteiles verbunden. Die Kanüle war mit einem Schlauch verbunden, der wiederum mit einer Boyle Mariott'sche Flasche (7) verbunden war. Die Boyle Mariott'sche Flasche enthielt die oben genannte Endothel-protektive Perfusionslösung und befand sich ca. 1,30 m oberhalb der Kammer zur Erzeugung eines natürlichen Druckgradienten (Δp). Durch einen definierten und konstanten Druck wurde die Perfusionslösung aus der Boyle Mariott'sche Flasche durch den Schlauch in die Kanüle und so in die Vene geleitet. Anschließend wurde der axial bewegliche Stempel (6) mit dem vorgeschalteten Blutgefäß abgedichtet in den Innenraum der Kammer eingeschoben. Unter mäßigem Druck wurde die Endothel-protektive Perfusionslösung in das Gefäß appliziert, so dass es zum Ausströmen der Perfusionsflüssigkeit über die Seitenäste des Gefäßes kommen konnte. Um den Ausführungsbereich der Vene gegen den Zylinderinnenraum der Kammer abzudichten, wurde die Rändelschraube im Dichtungsbereich (3) weiter nach Innen geschraubt, so dass das Ausströmen über die in diesem Bereich liegenden Seitenäste rasch unterblieb. Durch weiteres Herausziehen der Vene kam es zum selektiven Ausspritzen von Perfusionslösung aus allen neu heraustretenden Seitenästen, die dann jeweils sofort ligiert werden konnten. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der intimalen Oberfläche wiesen einen vollkommenen Erhalt (100%) der Endothel-Schicht nach.

Beispiel 2: Regeneration von Endothel-Gewebe der *Vena saphena* durch Behandlung mit einer Ausführungsform der Endothel-konservierenden Perfusionslösung

Um die Wirkung der Endothel-protektiven Perfusionslösung und des erfindungsgemäßen Verfahrens zu verdeutlichen, wurden isolierte Endothelzellen aus der menschlichen *Vena saphena* während der Inkubation mit verschiedenen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Perfusionslösungen nach Behandlung der Zellen mikroskopisch beobachtet und die Wirkung wurde durch Serien- bzw. Video-Zeitraffer-Mikrophotographie dokumentiert.

Endothelzellen aus kardiochirurgisch nicht mehr benötigten Reststücken der menschlichen *Vena saphena* wurden durch Kollagenase-Inkubation selektiv abgelöst und in Minimal-Essential-Medium (z.B. „Dulbecco minimal essential medium", DMEM) unter Zusatz von 10% v/v fötalem Kälberserum in Wasserdampf-gesättigter atmosphärischer Luft bei Zufuhr von 5% v/v Kohlendioxid bei einer Temperatur von 37 °C („Brutschrankbedingungen") bis zur Konfluenz gezüchtet. Anschließend wurden ausgewählte Schalen in ein Inkubationssystem eingebracht, das auf dem Objekttisch eines Zeiss-Axiovert-Mikroskops fest montiert war und für die Konstanz der oben bezeichneten Wachstumsbedingungen garantierte. Die kontinuierliche photographische Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Computer-gesteuerten Zeiss AxioCam-Kamera unter Verwendung von Software die von Zeiss entwickelt wurde und unter Einsatz von Gelblicht mit der geringsten, technisch gerade noch zur Abbildung der jeweiligen Endothel-Schicht ausreichenden Beleuchtungsstärke. Zwischen den einzelnen, automatisch ausgelösten Einzelaufnehmen wurden die Kulturen durch eine automatisch einfahrbare Blende vom Licht der Mikroskoplampe abgeschirmt.

Zunächst wurden die auf diese Weise präparierten Endothelzellen in herkömmlicher und bisher im chirugischen Bereich eingesetzten Saline inkubiert (Figur 2; Lösung 1). Die Saline hatte folgende Zusammensetzung: 154 mM (0,9 Gew.-%) NaCl in di-destilliertem Wasser.

Die Aufnahmen dokumentieren den Zustand der Endothelzellen zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation mit Saline. Die Ausgangskultur (0 Minuten) zeigte eine intakte Endothelzell-Schicht. Mit fortschreitender Inkubation mit Saline kam es jedoch schon innerhalb weniger Minuten zu einem kugelförmigen Ablösen der Endothelzellen und zum Absterben von Endothelzellen. Dies führte zu einer völligen Zerstörung des Gewebeverbandes. Nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten waren nahezu alle untersuchten Endothelzellen kugelig von der Oberfläche abgelöst und abgestorben.

Im Gegensatz dazu, führte eine Behandlung der isolierten Endothelzellen mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung (Figur 3; Lösung 2), die natives Albumin enthielt, zu einer Erhaltung der Endothelzellen über den gesamten beobachteten Inkubationszeitraum. Auch unterblieb bei Verwendung dieser Lösung eine mitotische Aktivität der Endothelzellen.

Die Lösung 2 in diesem Beispiel hatte folgende Zusammensetzung: Physiologische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin. Die Perfusionslösung enthielt außerdem: 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Die Inkubation der kultivierten Endothelzellen in der Lösung 2 führte zu einer weitgehenden Erhaltung der endothelialen Gewebearchitektur und zu einer hohen Dichte des Zellrasens. Insbesondere beobachtete man kein kugeliges Ablösen oder Absterben der Endothelzellen. Nach ca. 180 Minuten stellte sich eine deutliche Weitung der Interzellularspalten zwischen einigen Endothelzellen heraus. Doch zeigt sich, dass die Funktion des Endothel-Gewebes, insbesondere die Abschirmung subendothelialer Gefäßwandbereiche in dieser Perfusionslösung erhalten bleibt. Somit bewirkt diese erfindungsgemäße, aber noch keine Serum-enthaltende Perfusionslösung, eine vollständige Vitalitätserhaltung von Endothelzellen bei gleichzeitiger Erhaltung ihrer wichtigsten Funktion.

In einem weiteren Experiment wurde das Regenerationspotential von Endothelzellen durch die Behandlung mit der erfindungsgemäßen, Serum-enthaltenden Perfusionslösung untersucht. Die isolierten und in Kultur gehaltenen Endothelzellen wurden mit einer Perfusionslösung (Figur 4; Lösung 5) behandelt.

Diese Serum-enthaltende Lösung (Lösung 5) hatte folgende Zusammensetzung: Physiologische Elektrolytlösung mit 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$. Vor Zugabe von $CaCl_2$ wurde der pH-Wert der Lösung bei atmosphärischen Luftbedingungen auf pH=7,40 eingestellt. Weiterhin enthielt die Perfusionslösung 10 Vol-% Lipoprotein-freies, Hämolysin-freies, homologes Serumpräparat aus einem Pool von Blutpräparaten, 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose,

200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Im Gegensatz zu Lösung 2, enthält die Lösung 5 homologes Serum anstelle von Albumin. Dies hat, wie nachfolgend gezeigt, nicht nur eine ausgeprägte strukturerhaltende Wirkung auf das Gewebe der Endothelzellen, sondern steigert auch die Teilungsfähigkeit der kultivierten Endothelzellen.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Lösung 5 waren Zellteilungen der Endothelzellen zu beobachten. Die Zellteilungskompetenz der Endothelzellen wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum aufrechterhalten. Die Inkubation der Endothelzellen in Lösung 5 führte daher zu einer Proliferation der Endothelzellen und damit auch zur Regenerationsfähigkeit des Endothelzellrasens.

Diese Daten verdeutlichen die Vorteile der erfindungsgemäßen Perfusionslösungen im Vergleich zu der herkömmlich verwendeten Lösungen, wie Saline-Lösung oder Bretschneider-Lösung. Die erfindungsgemäße Perfusionslösung führt einerseits zur Erhaltung von Endothelzell-Gewebe und hat andererseits die Fähigkeit, Endothelzellen zur Teilung anzuregen. Dies ist besonders im Hinblick auf die Regeneration beschädigter Endothel-Schichten bei biologischen Gefäßen vorteilhaft und bei der Vorbereitung bzw. Herstellung von biologischen Gefäßen bzw. Gefäßtransplantaten wünschenswert. Auch hat die erfindungsgemäße Perfusionslösung die herausragende Eigenschaft, dass die biologischen Gefäße bis zu Wochen in der Perfusionslösung aufbewahrt werden können, ohne dass es hierbei zur Schädigung oder Beeinträchtigung der Endothel-Schicht kommt.

Beispiel 3: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von Quercetin

Im folgenden Beispiel wurde die Wirkung von Quercetin, ein natürlich vorkommendes, anti-entzündlich wirkendes Flavonoid, auf das Endothel der kleinsten Köpervenen (Venolen) ausführlich untersucht (siehe Figur 5).

Dazu wurden verschiedene isolierte menschliche Spenderherzen mit der Grundlösung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung in der Gegenwart und Abwesenheit von Quercetin durchspült. Diese Lösung hatte folgende Zusammensetzung: Isotonische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin. Die Perfusionslösung enthielt außerdem: 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich 100 µM frisch zugesetztes Quercetin.

Zur Untersuchung der myokardialen Arteriolen und Venolen (die bei von einem Verschluss besonders betroffen sind) erfolgte eine proteolytische Isolierung der Arteriolen und Venolen aus den menschlichen Spenderherzen und eine Aufreinigung durch isopyknische Zentrifugation. Die Endothelzellen wurden in Kultur gehalten. Zur Messung der hydraulischen Konduktivität wurden Endothel-Zellkulturen auf Polycarbonat Filtern etabliert.

Figur 5 zeigt eine 8-teilige Bilderfolge der kultivierten venulären Endothelzellen des menschlichen Herzens und die Wirkung von Quercetin auf das Endothel: In der Ausgangssituation (Ausgangskultur) wurden die Zellen mit der oben beschriebenen Grundlösung behandelt, die kein Quercetin enthält. Die Ausgangskultur weist einen dichten Zellrasen auf. Im Inkubationsverlauf wurde dieser Zellrasen durch die kontraktilen Freisetzungsprodukte aus aktivierten Plättchen und Granulozyten des humanen Blutes stark zur Kontraktion und damit zur Undichtigkeit gebracht, was sich durch offene Stellen im Endothelrasen äußerte. Nach Zusatz von Quercetin beobachtet man eine Regeneration des Endothelrasens, der im Laufe der Inkubation in der Quercetin-enthaltenden Perfusionslösung genauso dicht wie in der Ausgangskultur geworden ist. Der mit dieser Inkubationslösung (einschließlich Quercetin) behandelte Endothelrasen zeigt eine > 98%ige Dichtigkeit der Interzellularfugen und eine sehr niedrige hydraulische Konduktivität < 1[cm x 10^{-6} x s^{-1}cm H_2O].

Somit zeigt sich, dass die Gegenwart von Quercetin in der Perfusionslösung die Regeneration von Endothelläsionen, welche durch die Freisetzungsprodukte von aktivierten und metabolisch kooperierenden Granulozyten und Thrombozyten verursacht werden, fördert und zur Erhaltung des Endothels beiträgt. Diese Lösung ist daher für die Verwendung in der

Organ- und Gefäßkonservierung zum Zwecke der Endothel-Erhaltung im Lumen der Gefäße hervorragend einsetzbar.

Beispiel 4: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von Rutosiden

In Analogie zu der zuvor beschriebenen Lösung des Beispiels 3 wurde ein anderes Flavonoid, Trihydroxyethyl-Rutosid, anstelle von Quercetin in die ansonsten identische Grundlösung zugesetzt.

Auch hier wurde der Endothelverband durch die Aktivität von aktivierten Granulozyten und Blutplättchen zerstört.

Ähnlich den Ergebnissen in Beispiel 3, zeigt die Gegenwart eines Flavonoids in der Grundlösung eine hervorragende Regeneration des Endothelrasens in den isolierten Gefäßen der eine > 98%ige Dichtigkeit der Interzellularfugen und eine sehr niedrige hydraulische Konduktivität < 1[cm x 10^{-6} x s^{-1}cm H_2O] aufwies.

Diese beiden Beispiele zeigen, dass Flavonoide die Zerstörung des Endothels in Gefäßen durch die Freisetzungsprodukte von Granulozyten und Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen vorbeugen und sogar therapieren kann.

Beispiel 5: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von vasorelaxierendem Papaverin

Gerade bei Bypass-Operationen können sich in den frisch aus dem Unterschenkel dissezierte Venen sehr häufig Spasmen entwickeln, die dann vom Chirurgen üblicherweise durch „Aufblasen" der Venen mit unter großem Druck injizierter isotonischer Kochsalzlösung durchbrochen werden. Dabei werden aber nicht nur die feinen Zellverbindungen der Gefäßmuskulatur durchbrochen, sondern auch die des luminalen Gefäßendothels, das als Folge dieser Behandlung in Folge abstirbt und weggespült wird. Durch Zugabe eines wirksamen Vasodilatators zur der Grundlösung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung kann die Bildung von Spasmen im Venenpräparat bis zur Implantation verhindert werden.

Die in diesem Beispiel eingesetzte Lösung hatte folgende Zusammensetzung: Isotonische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin. Die Perfusionslösung enthielt außerdem: 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich 100µM Papaverin.

Figur 6 zeigt den Endothelrasen von isolierten Körpervenensegmenten vor und 3 Stunden nach der Inkubation in Papaverin-haltigem Medium. Die Gegenwart eines Vasodilators wie Papaverin in der Inkubationslösung führte zu keinerlei Beeinträchtigung der Dichtigkeit des Gefäßendothels. Figur 6 zeigt dazu eine Photographie einer 630-fachen Vergrößerung des Endothelrasens. Die obere Abbildung der Figur 6 zeigt den Endothelrasen unmittelbar vor der Zugabe von Papaverin. Die untere Abbildung zeigt den Zustand des Endothels 3 Stunden nach Zugabe von Papaverin.

Weiterhin wurde festgestellt, dass bei jeweils 18 untersuchten und zuvor in isotonischer Kochsalzlösung gelagerten Venensegmenten immerhin 7 Venensegmente einen so starken Spasmus entwickelten, dass eine Perfusion unter normalem arteriellen Mitteldruck (100 mm Hg) nicht mehr möglich war. Hingegen zeigte keine einzige der 18 Venen nach Lagerung in der oben angegebenen Lösung einen Spasmus, d.h. die Venen waren frei durchgängig.

Das mit der oben beschriebenen Perfusionslösung behandelte Endothel wies eine hervorragende Dichtigkeit (> 98%) der Interzellularfugen und eine sehr niedrige hydraulische Konduktivität < 1[cm x 10^{-6} x s^{-1}cm H_2O] auf.

Somit kann ein Vasodilator in praktischer Weise bei Gefäß- und Organtransplantationen zugesetzt werden und dazu beitragen, dass neben der Erhaltung des Endothels, auch die Bildung von Spasmen verhindert wird. Nicht zuletzt ist das Relaxieren der Muskulatur eines zu transplantierenden Organs oder Gefäßes für die Handhabung durch den Chirugen und für das bequeme Einsetzen des Organs in den Körper wünschenswert.

Beispiel 6: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von Adenosin

Auch mit Adenosin als Mittel zur Spasmusverhinderung wurden analoge Ergebnisse zu den in Beispiel 5 geschilderten Ergebnissen gewonnen.

Adenosin ist eine physiologisch vorkommende Verbindung, die (wie Papaverin in Beispiel 5) Gefäße wie Venen stark relaxieren kann. Der Vorteil von Adenosin liegt darin, dass dieses Nukleosid im Körper rasch zu gefäßphysiologisch inaktiven Folgeprodukten abgebaut werden kann, so dass keinerlei systemische Effekte auf den Koronarkreislauf zu erwarten sind. Die in diesem Beispiel eingesetzte Lösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie oben in Beispiel 5 beschrieben, allerdings enthielt sie 1 mM Adenosin anstelle von Papaverin. Bei den durchgeführten Experimenten und den nachfolgenden Untersuchungen an Zellkulturen und isolierten Venensegmenten, konnten man eine hervorragende Geschlossenheit des Endothelrasens feststellen. Dies ist nicht zuletzt auch deshalb der Fall, weil Adenosin in starkem Ausmaß zum vollen physiologischen Aufbau der ATP-Vorräte des Gefäßendothels genutzt wird und somit als Energielieferant zur Verfügung steht (entsprechend Pyruvat und Glucose in einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung).

Zusätzlich sollte bemerkt werden, dass die ATP-Spiegel von Endothelzellen in der oben angegebenen Grundlösung (ohne Adenosin) 4,25±0,36 mM (n=6) betrugen, in Gegenwart von Adenosin aber 5,33±0,48 mM (n=7). Dies deutet auf eine optimalisierte energetische Situation im Endothel hin.

Somit zeigte die Gegenwart von Adenosin in der Inkubationslösung keinerlei Beeinträchtigung der Dichtigkeit des Gefäßendothels durch den Vasodilatator sowohl in Zellkulturen als auch in isolierten Venensegmenten. Diese Lösung ist daher für die Konservierung von Endothel in Gefäßen und Organen geeignet bei gleichzeitiger Vorbeugung von Spasmenbildung.

Beispiel 7: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von Wachstumsfaktoren (EGF, bFGF)

In diesem Beispiel wurde eine Perfusionslösung eingesetzt, welche Wachstumsfaktoren (bFGF, EGF) und Wachstumshormone (Hydrocortison) enthielt. Diese Faktoren haben einen günstigen Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen verschiedener vaskulärer Herkunft.

Die in diesem Beispiel verwendete Perfusionslösung hatte folgende Zusammensetzung: Isotonische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM $CaCl_2$ (pH auf 7,40 vor Zugabe von $CaCl_2$); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin. Die Perfusionslösung enthielt außerdem: 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von Pharmacia Ltd.: 100 µl/100 ml fertige Lösung). Außerdem enthielt die Lösung 0,1-1 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 0,2- 2 ng/ml basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und Hydrocortison 0,2-3 µg/ml.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass die Geschlossenheit des endothelialen Zellrasens in diesem Medium >98% war. Die Generationszeit der Zellen ohne Wachstumsfaktoren betrug 62 h ±4, mit Wachstumsfaktoren betrug die Generationszeit 19 h±3 (n jeweils 8). Somit zeigen die Endothelzellen eine deutlich verkürzte Generationszeit in diesem Medium gegenüber der Kontrolllösung, welche keine Wachstumsfaktoren enthielt.

Beispiel 8: Bevorzugte Perfusionslösung bzw. Inkubationslösung unter Einschluß von kardioplegisch wirkenden KCl

In diesem Beispiel wurde die Reaktion gezüchteter Endohelzellen aus der humanen *Vena saphena* auf kardioplegische Kaliumkonzentrationen untersucht (siehe Figur 7).

Die physiologische Kalium-Konzentration im Blutplasma beträgt etwa 4-5 mM. Werden die Kaliumkonzentrationen im Extrazellularraum auf Konzentrationen > 6 mM erhöht (kardioplegische Lösung), stellt sich eine zunehmende, bei etwa 8 mM eine vollkommene Lähmung der elektrischen Aktivität ein. Ein Herz kann dann nicht mehr schlagen. In der Herzchirurgie werden solche Perfusionslösungen eingesetzt, um Herzen während der Operation (z.B. bei einer Herz-Transplantation) still zu stellen.

In diesem Beispiel wurde menschliches Poolplasma 2 Tage lang gegen folgende Lösung (in der Herzchirurgie weithin als kardioplegische Lösung eingesetzte „Bretschneider-Lösung") dialysiert: 15 mM NaCl, 10 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0,015 mM $CaCl_2$, 1 mM α-Ketoglutarsäure, 198 mM Histidin, 2 mM L-Tryptophan, 30 mM Mannitol, mit HCl auf pH =

7,4 eingestellt. Die dialysierte Lösung wurde steril filtriert und in wie zuvor beschrieben zur Behandlung eingesetzt.

Die Figur 7 zeigt die Reaktion gezüchteter Endothelzellen menschlichen Ursprungs auf die hohen Kaliumkonzentrationen in der Lösung im Zeitverlauf. Es kommt zu einer deutlichen Spaltbildung im Bereich der Interzellularbereiche, aber nicht zur Ablösung der Zellen. Es wurden systematische Perfusionsversuche an isolierten Rinderherzen nach Perfusion mit

1. (kristalloider) Bretschneiderlösung unter Zusatz von 0.1% Evans Blue (Kontrolle)
2. analog mit Evans Blue versetzter Perfusionslösung

durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der auf der auf das jeweilige Herzgewicht bezogene Farbstoffgehalt in den mit der oben beschriebenen Perfusionslösung perfundierten Herzen um durchschnittlich 16±3,5% (n jeweils 6) über den der Kontrolle (Bretschneiderlösung) lagen. Mit anderen Worten: Etwa 16% zusätzliches Myokard war bei Behandlung mit der erfindungsgemäßen Inkubationslösung überlebensfähig. Diese Befunde beweisen, dass die Perfusion des Myokards durch Zusatz der Plasmaproteine um den selben Wert verbessert wurde.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Endothelzellen in intakten Venensegmenten und in Zellkultur ihre Interzellularspalten unter den in der Kardiochirurgie unvermeidlich hohen Kaliumkonzentrationen deutlich erkennbar öffneten, rundeten sich aber nicht ab und blieben über Stunden am jeweiligen Untergrund haften. Die hohen Spiegel der Plasmaproteine in der erfindungsgemäßen Perfusionslösung gewährleisten, dass eine solche kardioplegische Lösung auch die kleinsten Kapillaren sicher perfundiert und damit einen uniformen Stillstand der Muskelaktivität in allen Myokardbereiche garantiert. Dadurch kommt es zu einem gleichmäßigeren Überleben aller Herzgewebebereiche.

Die Verwendung der oben beschriebenen kardioplegischen Lösung resultierte in eine deutlich verbesserte Endothelgeschlossenheit, bessere Endothelerhaltung, aber auch gleichmäßigere, homogenere Myokardperfusion und -Erhaltung.

Beispiel 9: Regeneration von Endothel-Gewebe der *Vena saphena* durch Behandlung mit einem Blutplasmapräparat als Endothel-protektive Perfusionslösung

Im folgenden Beispiel wurde die Wirkung einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung, die von einem Blutplasmapräparat abgeleitet ist, auf das Endothel-Gewebe von isolierten *Vena saphena* Segmenten untersucht (Figur 11).

Das eingesetzte Blutplasmapräparat enthielt die folgende Zusammensetzung:

150 mM Natrium-Ionen, 3,65 mM Kalium-Ionen, 1,97 mM Calcium-Ionen, 1 mM Magnesium-Ionen, 107 mM Chlorid-Ionen, 32 g/l Albumin, Immunglobuline IgG 7 g/l, IgA 1,7 g/l, und IgM 0,5g/l und 51 g/l Gesamt-Protein und natürliche im Blutplasma enthaltende Nährstoff- und Energielieferanten. Das Blutplasmapräparat wurde zudem noch zur Virusinaktivierung mit β-Propionlacton und UV behandelt.

Es wurden, wie in den anderen Beispielen auch, confokale Mikroskopien an isolierten Venen-Segmenten durchgeführt. Dazu wurde die *Vena saphena* für 60 min mit dem Blutplasmapräparat behandelt. Als Kontroll-Lösungen diente Saline oder Bretschneider Lösung. Die Behandlung mit diesen Kontrolllösungen führte bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten zu drastischen Endothellläsionen (Lp der kultivierten endothelialen Zellen = 1,2 +/- 0,3 cm x 10^{-6} x s^{-1} x cmH_2O; n=5) und einem starken Ablösung von Endothelzellen von den Gefäßwänden.

Die Behandlung mit dem Blutplasmapräparat (n=141) führte hingegen zu keiner Ablösung von Endothelzellen, sondern zu einem dichten Endothel-Gewebe. Das Endothelium der *Vena saphena* Segmente bleibt an der Gefäßwand haften. Der Gewebefaktor TF, ist in den mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung gemessenen Venen kaum messbar (2,6 fmol x min^{-1} x cm^{-2} +/- 1,5; n=5) nach der Inkubation (1 h) in den Kontrolllösungen aber sehr hoch (8,2 fmol x min^{-1} x cm^{-2} +/- 3,3; n=5). Dies ist auf die Koagulationsfaktoren zurückzuführen, welche zunehmend den Kontakt mit Perizyten-ähnlichen Zellen über offene Endothelspalten herstellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die erfindungsgemäßen Perfusionslösungen in all ihren Ausführungsformen das luminale Endothel von Gefäßen und Organen konservieren bzw.

regenerieren kann und eine lange Offenheitsrate und damit eine lange Funktion der Hohlorgane und Lebensdauer von Transplantaten sicherstellt.

Beispiel 10: Ausführungsform des Blutplasmapräparats als Perfusionslösung unter Einschluß von Papaverin

Gleiche Ergebnisse wie in Beispiel 10 beschrieben, wurden mit einer Perfusionslösung (Blutplasmapräparat nach Beispiel 9) erhalten, die zusätzlich 10 µM Papaverin als Vasodilator enthielt. Neben der Erhaltung des Endothelrasens konnte durch den Zusatz von Papaverin auch die Spasmenbildung reduziert bzw. verhindert werden.

Beispiel 11: Ausführungsform des Blutplasmapräparats als Perfusionslösung unter Einschluß von KCl (kardioplegische Perfusionslösung)

In analoger Weise konnte auch die elektrische Aktivität mit einer kardioplegischen Perfusionslösung (Blutplasmapräparat nach Beispiel 9) an isolierten Herzen verhindert werden. Die eingesetzte Lösung enthielt 20 mM KCl anstelle der in der Grundlösung des Blutplasmapräparats angegebenen KCl-Konzentrationen.

Diese Lösung eignet sich in hervorragender Weise, das Endothel bei Operationen zu schützen und das Transplantat (z.B. Gefäß, Organ) infolge des hohen Kalium-Gehalts durch die Inkubation in der kardioplegischen Perfusionslösung ruhig zu stellen.

Beispiel 12: In vivo-Studien an Bypass-Patienten

Um die Übertragbarkeit der bisher gezeigten Ergebnisse auch in der Praxis an lebenden Patienten zu demonstrieren, wurde eine Studie an Bypass-Patienten im Krankenhaus durchgeführt (Figuren 8-11).

Die in vivo Studie wurde so durchgeführt, dass jeweils 25 frisch explantierte *Venus saphena* von Bypass-Patienten mit einer der vier folgenden Lösungen durchspült und anschließend ca. 30-60 min in derselben Lösung bis zur Implantation bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde:

1. Isotonische Kochsalzlösung (Saline) als Kontrolle (Figur 8)
2. Bretschneider-Lösung (kardioplegisch) als Kontrolle (Figur 9)
3. Isotonische Perfusionslösung des Beispiels 2 mit 5% Albumin (Figur 10)
4. Blutplasmapräparat (entsprechend Beispiel 9; Figur 11)

Unmittelbar nach der Explantation und Durchspülung mit den oben genannten Lösungen (Lösungen 1-4 in diesem Beispiel; Figuren 8-11) und direkt nach dem Einlegen in diese Lösungen sowie unmittelbar vor der Transplantation (also ca. 30-60 min nach Explantation) wurden ca. 5 mm lange Stücke von dem jeweiligen Venensegment abgeschnitten und in Formaldehyd-/Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Ein Teil des Venensegments wurde für insgesamt 8 Stunden in der jeweiligen Inkubationslösung für Kontrollzwecke inkubiert, der Hauptteil der Vene wurde jedoch transplantiert. In den fixierten Teilsegmenten erfolgte eine Silber-Imprägnierung der Zellfugen, so dass anschließend die Integrität der Endothelabdeckung der Gefäß-Intima an den verschiedenen Zeitpunkten quantitativ bewertet werden konnte. Es zeigte sich, dass in den Lösungen 1 und 2 (Saline bzw. Bretschneiderlösung) die Endothelabdeckung der Gefäße oft gar nicht mehr nachweisbar war und meist nur noch kleine Inseln davon übrig waren (Figuren 8-9). Dazwischen hatten subendotheliale Wandschichten direkten Zugang zum Lumen. Die in den Lösungen 1 und 2 inkubierte gezüchtete Endothelzellen, aber auch das Endothel intakter Venen erwiesen sich aufgrund ihrer endothelialen Lückenhaftigkeit für wässrige Medien, die im Lumen unter leichten Überdruck appliziert wurden, als leicht durchgängig. Es kam zu einem entsprechenden transmuralen Wassertransport, dessen Größe sich exakt als Hydraulische Konduktivität messen lässt.

Im Falle der Inkubation mit den erfindungsgemäßen Perfusionslösungen 3 und 4 ließ sich eine geringere bzw. im Falle der Perfusionslösung 4 nur eine ganz geringe hydraulische Konduktivität ermitteln, was ein Beleg für die hohe Dichtigkeit und Kontinuität der Endothelabdeckung ist (Figuren 10-11).

In Parallelversuchen wurde ermittelt, wie nach der Inkubation von längeren Venensegmenten mit jeweils einer der vier oben angegebenen Lösungen und anschließender Füllung mit einem standardisierten Gemisch aus Gerinnungsfaktoren (BBSB) einige der darin enthaltenen Faktoren durch den in tieferen Wandschichten lokalisierten „Gewebefaktor“ (TF) aktiviert werden. Letzterer ist vermutlich ausschlaggebend für alle klinisch auftretenden intravasalen

Thromboseereignisse. Normalerweise wird der Gewebefaktor durch das intakte Gefäß-Endothel vom Blut (und damit den Gerinnungsfaktoren im Plasma) abgeschirmt. Genau das ist auch der Fall, wenn die Venen vorher mit einer der erfindungsgemäßen Perfusionslösungen inkubiert wurden. In den Fällen, bei denen die Kontrollösungen 1 und 2 verwendet wurden, erwies sich die Wand als prothrombogen, weil die intravasal angebotenen Gerinnungsfaktoren durch das lückenhafte Endothel in die tieferen Wandschichten diffundieren konnten und dort in Kontakt mit dem Gewebefaktor gerieten.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit *Arteria mammaria int.*-Bypässen gewonnen (nicht gezeigt), so dass das erfindungsgemäße Verfahren auf keinen Fall auf einen bestimmten Gefäßtyp oder Organ beschränkt ist.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Erfindung eine hervorragende Möglichkeit zur Behandlung, Herstellung und Konservierung von isolierten Hohlorganen und biologischen Gefäßen bei Operationen, Transplantationen, Transport und Inkubationen. Die mit einer der hier beschriebenen erfindungsgemäßen Perfusionslösungen behandelten Hohlorgane bzw. biologischen Gefäße eignen sich somit für den Einsatz als Gefäß- oder Organ-Prothesen (z.B. Bypass) mit langer Lebenszeit und Funktionalität. Das heute noch große Risiko einer Restenosierung solcher Prothesen wird zum Wohle der Patienten durch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Perfusionslösung erheblich verringert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen, umfassend das In-Kontakt-Bringen eines isolierten Hohlorgans mit einer Endothel-protektiven Perfusionslösung, wobei die Endothel-protektive Perfusionslösung mindestens die folgenden Bestandteile umfasst:

   (a) physiologische Elektrolytlösung
   (b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin
   (c) Nährstoffsubstrat;

   wobei die Behandlung zur Konservierung und/oder Reparatur des Endothel-Gewebes im Lumen des Hohlorgans führt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch 1-10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch ein homologes anti-koaguliertes Blutplasmapräparat ersetzt wird, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das anti-koagulierte Blutplasmapräparat Natrium-Ionen, Kalium-Ionen, Calcium-Ionen, Magnesium-Ionen, Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, Albumin und Immunglobuline enthält.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das anti-koagulierte Blutplasmapräparat folgende Zusammensetzung umfasst: Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa

50-200 mM Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, davon etwa 25-45 g/l Albumin, 3-15 g/l, IgG, 1-10 g/l IgA und 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline, bei einem pH-Wert von etwa 7,3 bis etwa 7,8 und einer Osmolarität von etwa 200-350 mosmol/kg.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei das Nährstoffsubstrat in der Endothel-protektiven Perfusionslösung L-Glutamin ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Konzentration von L-Glutamin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung 0,5-10 mM beträgt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die physiologische Elektrolytlösung 2-10 mM Glukose und/oder 1-10 mM Pyruvat enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die physiologische Elektrolytlösung 0,1-0,6 U/ml Heparin und/oder jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die physiologische Elektrolytlösung folgende Bestandteile umfasst: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM $MgSO_4$; 0,5-2 mM KH_2PO_4; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM $CaCl_2$.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Endothel-protektive Perfusionslösung ein anti-koaguliertes und nicht-agglutinierendes Blutplasmapräparat ist, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Blutplasmapräparat folgende Bestandteile umfasst: 100-170 mM Natrium-Ionen, 1-15 mM Kalium-Ionen, 1-6 mM Calcium-Ionen, 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, 50-200 mM Chlorid-Ionen, 25-45 g/l Albumin, 3-15 g/l IgG, 1-10 g/l IgA und 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Blutplasmapräparat mit β-Propiolacton und UV-Bestrahlung zur Virusinaktivierung behandelt wurde.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, wobei die Perfusionslösung einen oder mehrere Endothel-fördernde Wachstumsfaktoren enthält.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Wachstumsfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) und Stammzell-Faktor (SCF).

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, wobei die Perfusionslösung Perfusionslösung Flavonoide enthält.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Flavonoide Quercetin und/oder Trihydroxyethyl-Rutosid sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, wobei die Perfusionslösung Papaverin und/oder Adenosin enthält.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-18, wobei die Perfusionslösung kardioplegische Kalium-Konzentrationen von mehr als 6 mM enthält.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, wobei es sich bei den Hohlorganen um Herz, Darm, Uterus, Niere, Harnblase, Lunge, Leber, Milz handelt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, wobei es sich bei den Hohlorganen um biologische Gefäße handelt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei es sich bei den biologischen Gefäßen um Blutgefäße oder Lymphgefäße handelt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-22, wobei die Endothel-protektive Perfusionsflüssigkeit mit Hilfe einer Apparatur nach einem der Ansprüche 47-51 durch das Hohlorgan geleitet wird.

24. Endothel-protektive Perfusionslösung, umfassend

(a) physiologische Elektrolytlösung

(b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin

(c) 0,5 bis 10 mM L-Glutamin

25. Perfusionslösung nach Anspruch 24, wobei das native Albumin durch 1-10 Vol-% homologes Hämolysin-freies Serum oder autologes Serum ersetzt wird.

26. Perfusionslösung nach Anspruch 24, wobei das native Albumin in der Endothel-protektiven Perfusionslösung durch ein homologes anti-koaguliertes Blutplasmapräparat ersetzt wird, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

27. Perfusionslösung nach Anspruch 26, wobei das anti-koagulierte Blutplasmapräparat Natrium-Ionen, Kalium-Ionen, Calcium-Ionen, Magnesium-Ionen, Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, Albumin und Immunglobuline enthält.

28. Perfusionslösung nach Anspruch 27, wobei das anti-koagulierte Blutplasmapräparat folgende Zusammensetzung umfasst: Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa 50-200 mM Chlorid-Ionen, humane Serumproteine, davon etwa 25-45 g/l Albumin, 3-15 g/l IgG, 1-10 g/l IgA und 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline, bei einem pH-Wert von etwa 7,3 bis etwa 7,8 und einer Osmolarität von etwa 200-350 mosmol/kg.

29. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-28, wobei die Konzentration von L-Glutamin 2,5 mM beträgt.

30. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-28, wobei die Konzentration von L-Glutamin 5 mM beträgt.

31. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-28, wobei die Konzentration von L-Glutamin 7,5 mM beträgt.

32. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-31, wobei die physiologische Elektrolytlösung folgende Bestandteile umfasst: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM $MgSO_4$; 0,5-2 mM KH_2PO_4; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM $CaCl_2$.

33. Perfusionslösung nach Anspruch 32, wobei die physiologische Elektrolytlösung 2-10 mM Glukose und/oder 1-10 mM Pyruvat enthält.

34. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 23-33, wobei die physiologische Elektrolytlösung 0,1-0,6 U/ml Heparin und/oder jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat enthält.

35. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 23-34, wobei der pH-Wert in der physiologischen Elektrolytlösung in atmosphärischer Luft 7,4 +/- 0,04 beträgt.

36. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-35, wobei die Endothel-protektive Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika enthält.

37. Perfusionslösung nach Anspruch 36, wobei es sich bei den Antibiotika um 50-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin handelt.

38. Perfusionslösung nach Anspruch 24, wobei die Perfusionslösung ein anti-koaguliertes und nicht-agglutinierendes Blutplasmapräparat ist, welches humane Plasmaproteine, anti-koagulatorisch wirkende Faktoren und Immunglobuline umfasst und bei dem die pro-koagulatorisch wirkenden Faktoren, Isoagglutinine und instabilen Komponenten des Blutplasmas entfernt worden sind.

39. Perfusionslösung nach Anspruch 38, wobei das Blutplasmapräparat folgende Bestandteile umfasst: Etwa 100-170 mM Natrium-Ionen, etwa 1-15 mM Kalium-Ionen, etwa 1-6 mM Calcium-Ionen, etwa 0,1-4 mM Magnesium-Ionen, etwa 50-200 mM Chlorid-Ionen, etwa 25-45 g/l Albumin, etwa 3-15 g/l IgG, etwa 1-10 g/l IgA und etwa 0,2-3 g/l IgM Immunglobuline.

40. Perfusionslösung nach Anspruch 39, wobei das Blutplasmapräparat mit β-Propiolacton und UV-Bestrahlung zur Virusinaktivierung behandelt wurde.

41. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-40, wobei die Lösung einen oder mehrere Endothel-fördernde Wachstumsfaktoren enthält.

42. Perfusionslösung nach Anspruch 41, wobei der Wachstumsfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) und Stammzell-Faktor (SCF).

43. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 25-42, wobei die Perfusionslösung Flavonoide enthält.

44. Perfusionslösung nach Anspruch 43, wobei die Flavonoide Quercetin und/oder Trihydroxyethyl-Rutosid sind.

45. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 25-44, wobei die Perfusionslösung Papaverin und/oder Adenosin enthält.

46. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 25-45, wobei die Perfusionslösung kardioplegische Kalium-Konzentrationen von mehr als 6 mM enthält.

47. Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen, umfassend eine Kammer (1), ein axial beweglicher Stempel (6), eine Kanüle (5), ein Vorratsbehälter (7), der Endothel-konservierende Perfusionsflüssigkeit enthält und eine Dichtungsvorrichtung (3), wobei die Kanüle mit dem axial beweglichen Stempel (6) verbunden ist, so dass die Kanüle mit dem Stempel in die Kammer bewegt werden kann und wobei die Dichtungsvorrichtung (3) ein Ende des Gefäßes umschließen kann und die Kanüle mit dem anderen Ende des Gefäßes verbunden werden kann, so dass die Endothel-protektive Perfusionslösung aus dem Vorratsbehälter (7), vorzugsweise unter einem Druckgradienten, selektiv in das biologische Gefäß geleitet werden kann.

48. Apparatur nach Anspruch 47, wobei die Dichtungsvorrichtung Dichtungsscheiben umfasst, die stapelförmig in einer Rändelschraube angeordnet sind.

49. Apparatur nach Anspruch 48, wobei die Dichtungsscheiben einen Durchmesser von 1-10 mm und/oder eine Dicke von 0,3-3 mm haben.

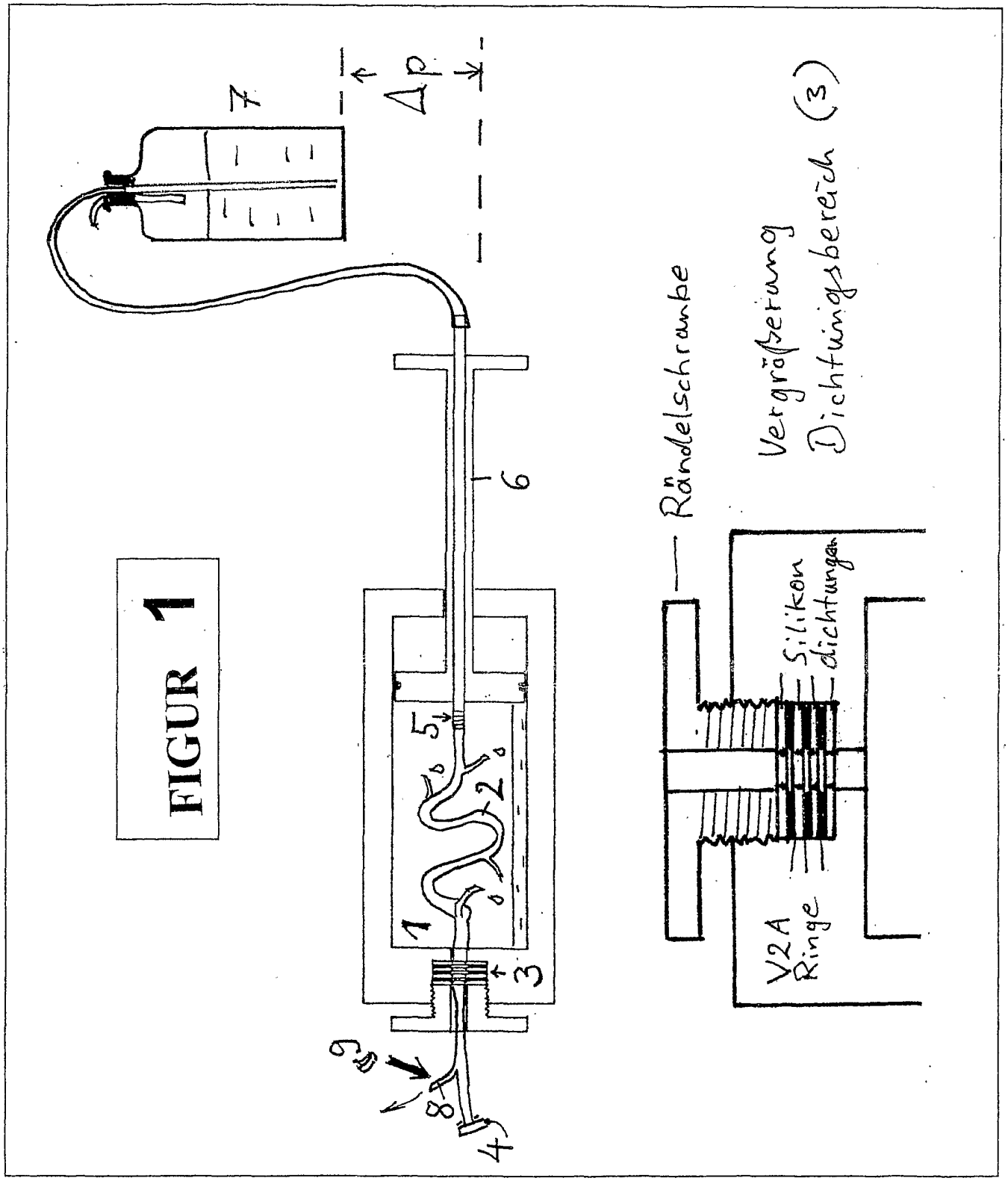
50. Apparatur nach einem der Ansprüche 47- 49, wobei der Apparat zusätzlich eine Thermostatisierungseinrichtung zum Erwärmen der Perfusionsflüssigkeit enthält.

51. Apparatur nach einem der Ansprüche 47-50, wobei die Endothel-protektive Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-46 definiert ist.

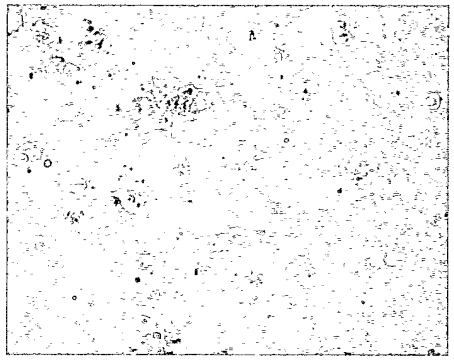
52. Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-46 zur Konservierung des Endothels in isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen.

53. Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-46 zur Aufrechterhaltung und/oder Reparatur des Endothel-Gewebes in isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen.

54. Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 24-46 zur Therapie und/oder Vorbeugung von Gefäßverschlüssen in isolierten Hohlorganen oder biologische Gefäßen.

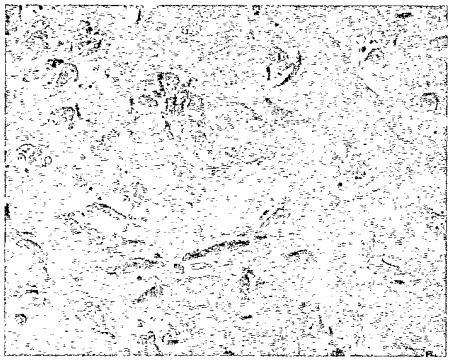

FIGUR 1
7
Δp
6
5
2
1
3
9
8
4
Rändelschraube
Vergrößerung
Dichtungsbereich (3)
Silikon
dichtungen
V2A
Ringe

Figur 2 Kultivierte Endothelschicht aus der Vena Saphena im Verlauf einer Inkubation mit Saline (Lösung 1)

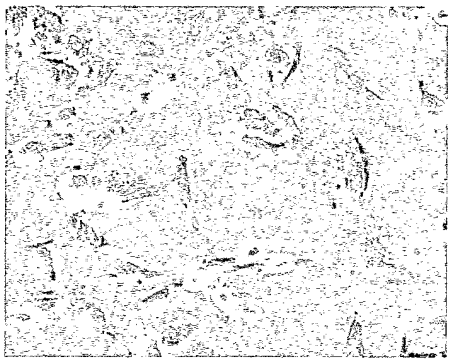


0 Minuten

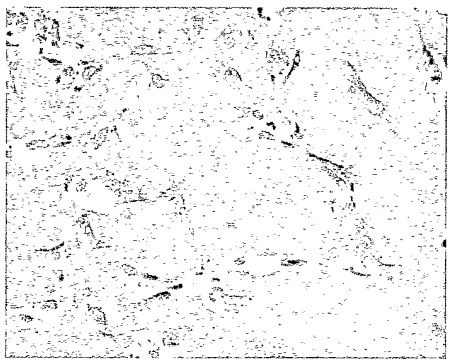
(unmittelbar vor Zugabe von Saline)



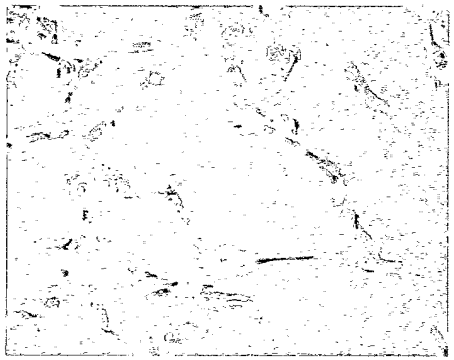
nach 2 Minuten



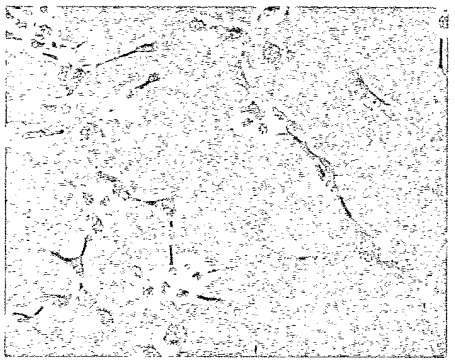
nach 4 Minuten



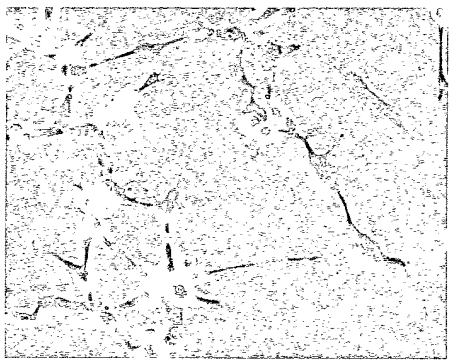
nach 6 Minuten



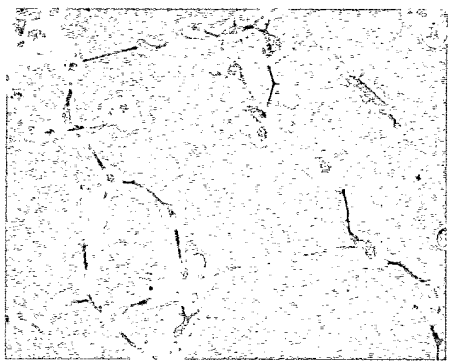
nach 8 Minuten



nach 30 Minuten

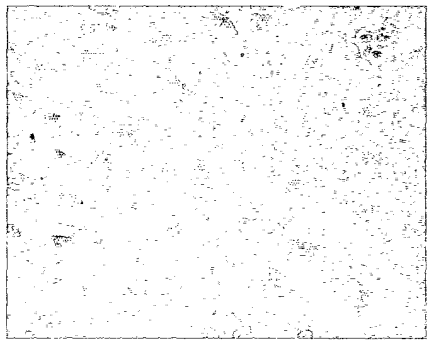


nach 60 Minuten



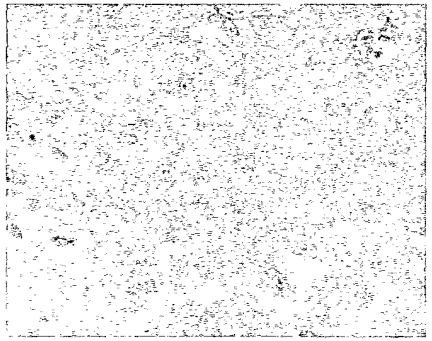
nach 180 Minuten

Figur 3 Kultiviertes Vena Saphena-Endothel in Lösung 2

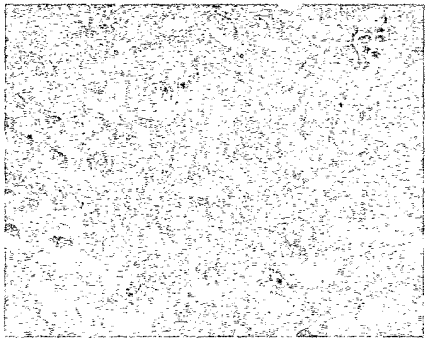


0 Minuten

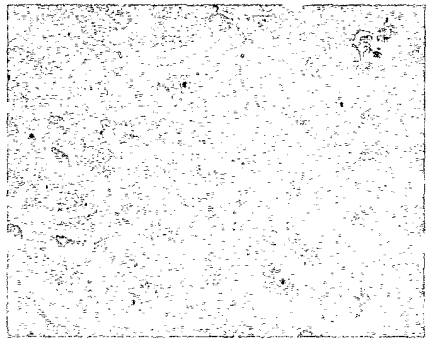
(unmittelbar vor Zugabe von Lösung 2



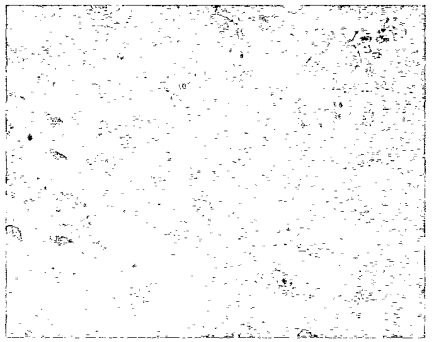
nach 2 Minuten



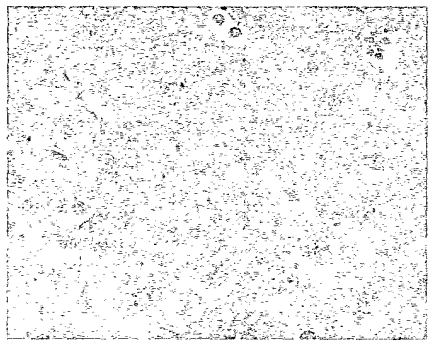
nach 4 Minuten



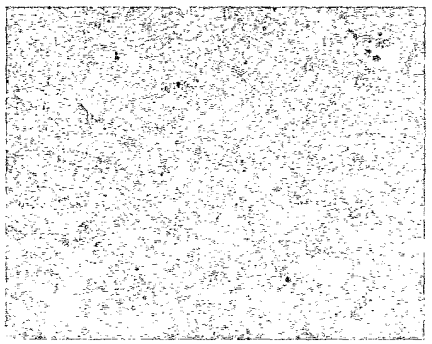
nach 6 Minuten



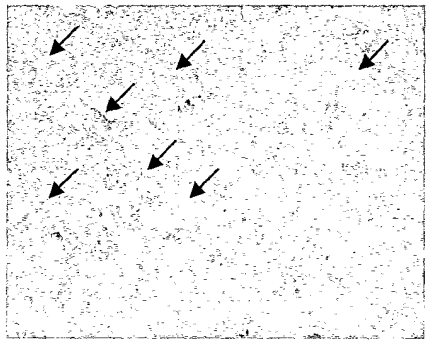
nach 8 Minuten



nach 30 Minuten



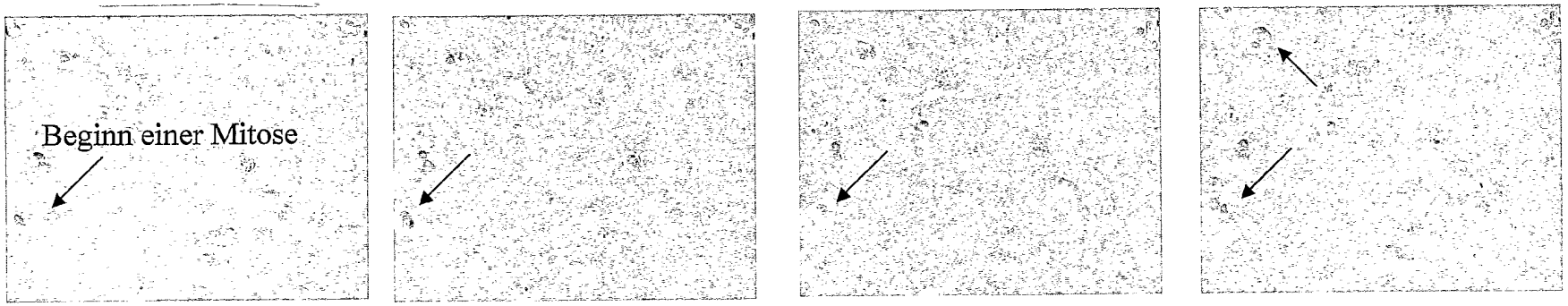
nach 60 Minuten



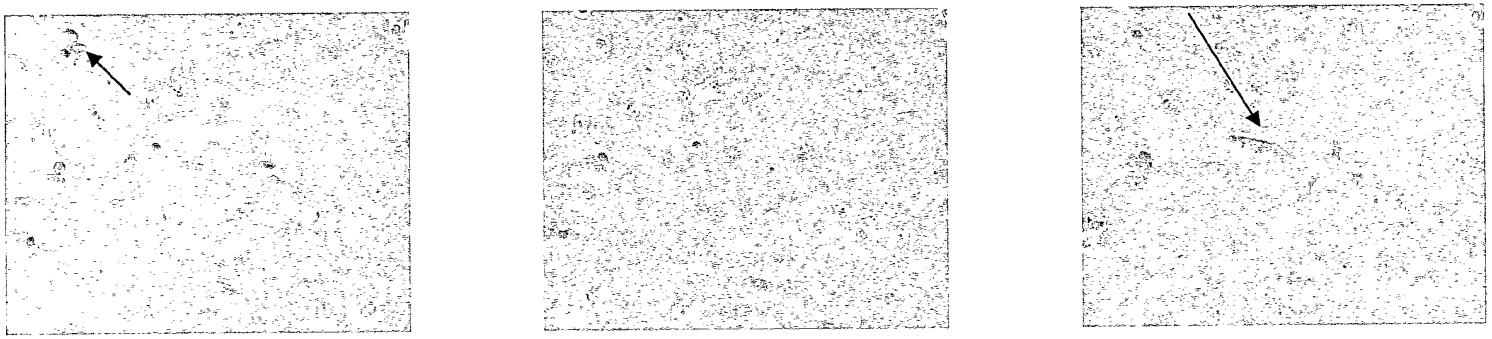
nach 180 Minuten

(deutliche Weitung der Interzellularspalten, Pfeile!)

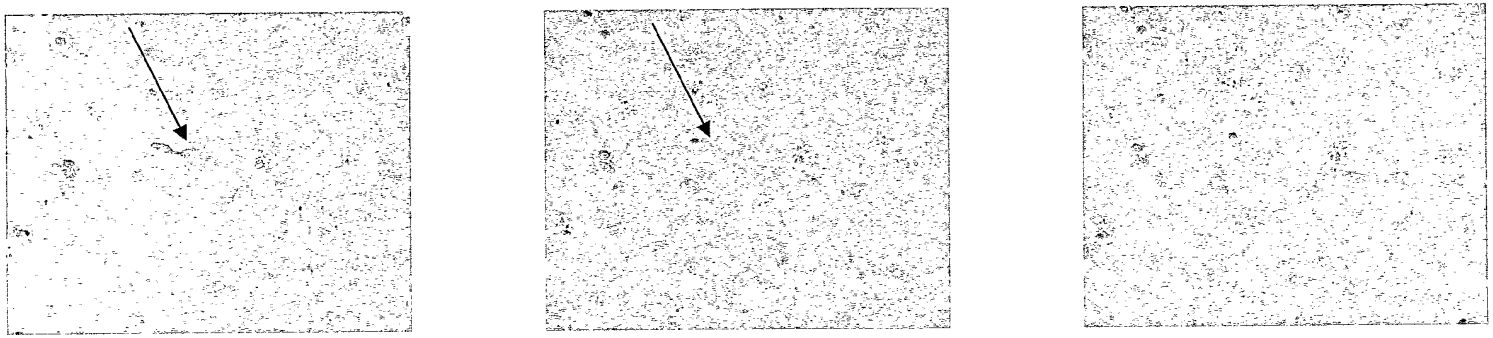
Figur 4 Kultiviertes Vena Saphena-Endothel in Lösung 5



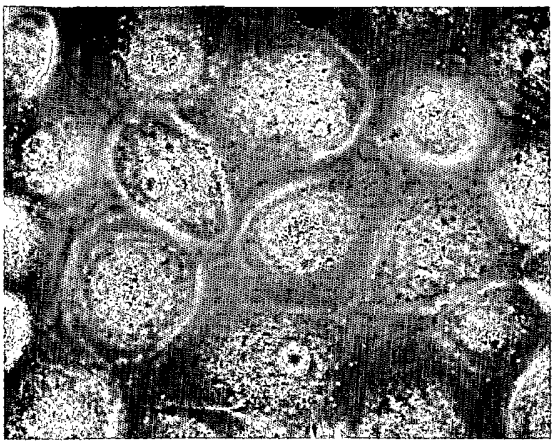
O Minuten | nach 30 Minuten | nach 70 Minuten | nach 130 Minuten



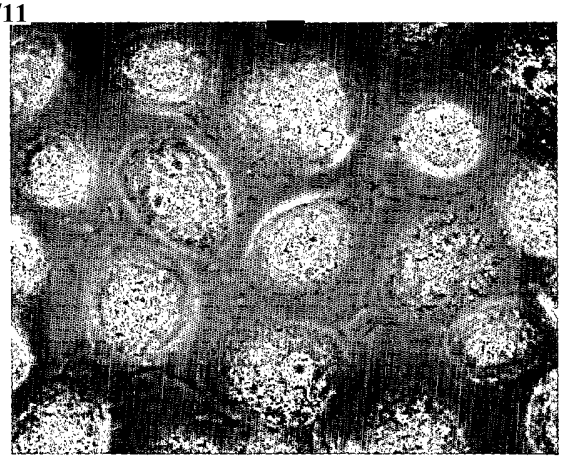
nach 150 Minuten | nach 175 Minuten | nach 225 Minuten



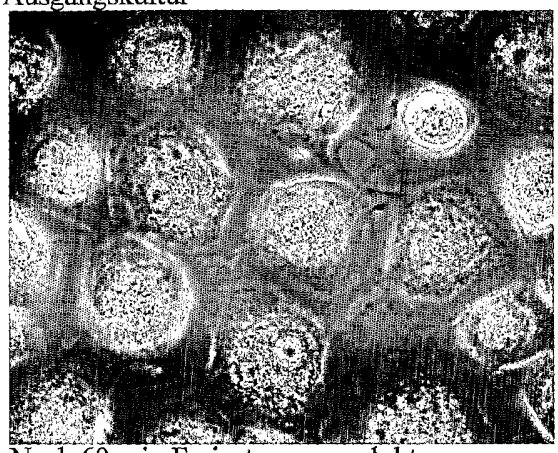
nach 230 Minuten | nach 270 Minuten | nach 300 Minuten



Ausgangskultur



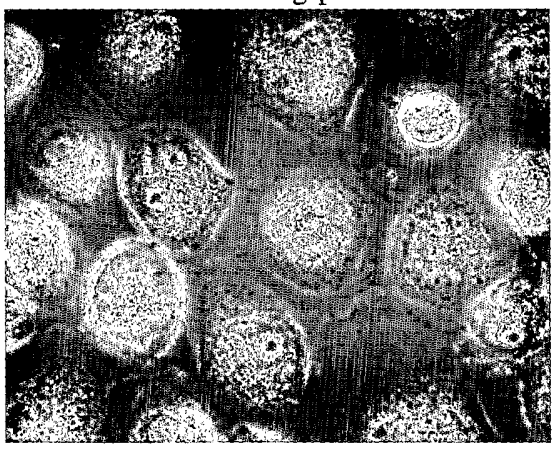
14 min Freisetzungsprodukte



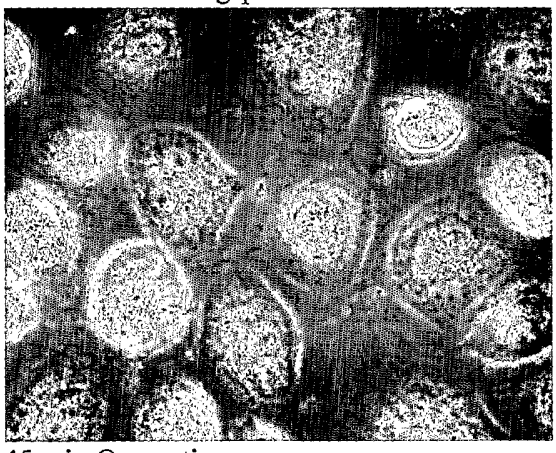
Nach 60 min Freisetzungsprodukte



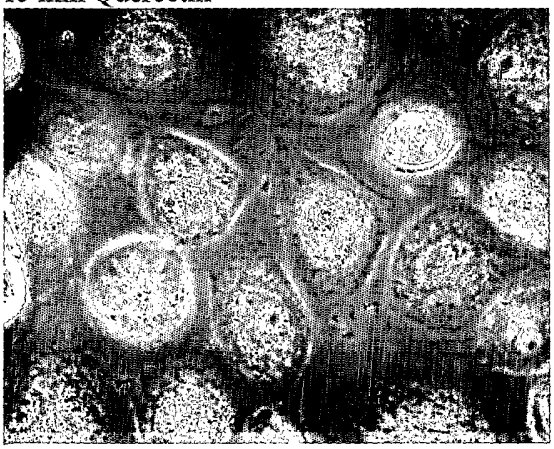
90 min Freisetzungsprodukte



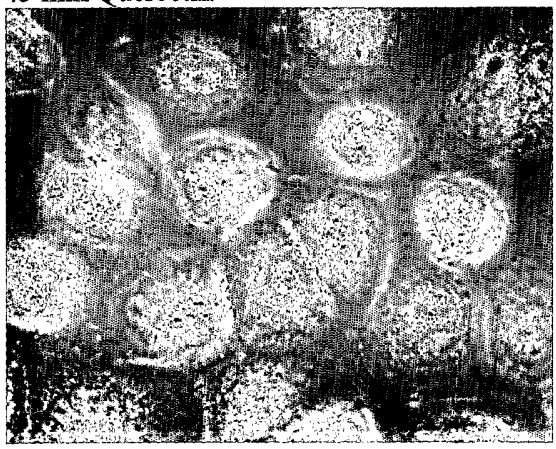
15 min Quercetin



45 min Quercetin



90 min Quercetin

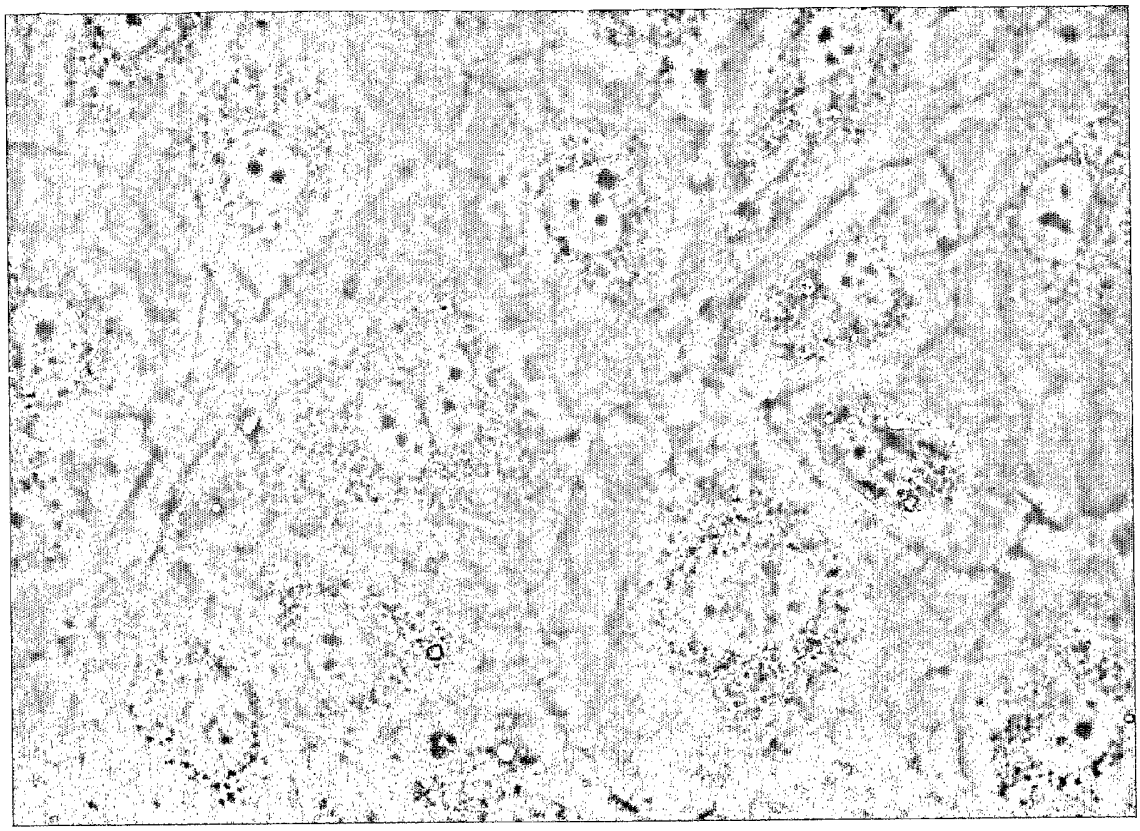


4 h 30 min Quercetin

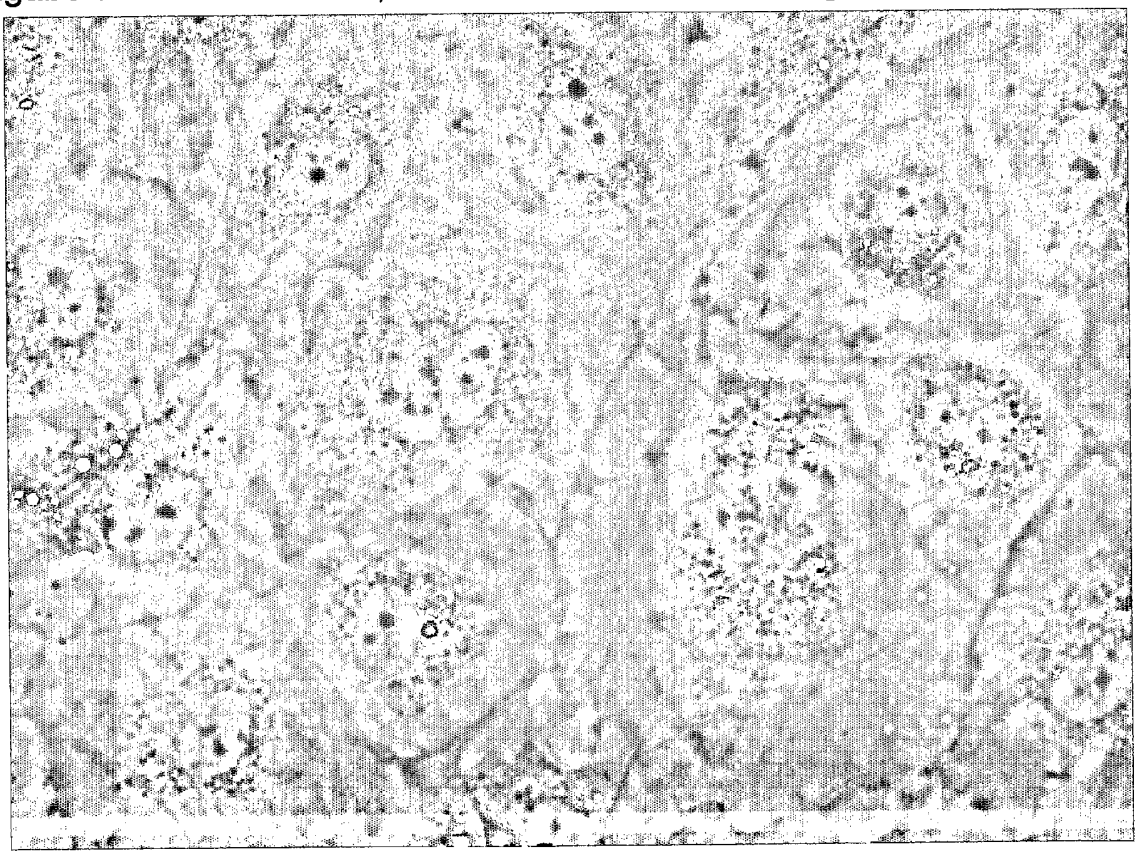
Extrakt-Quercetin 07.01.04

Kultivierte venuläre Endothelzellen unter der Einwirkung von Freisetzungsprodukten aus Plättchen/Granulozyten und anschließend auch von Quercetin

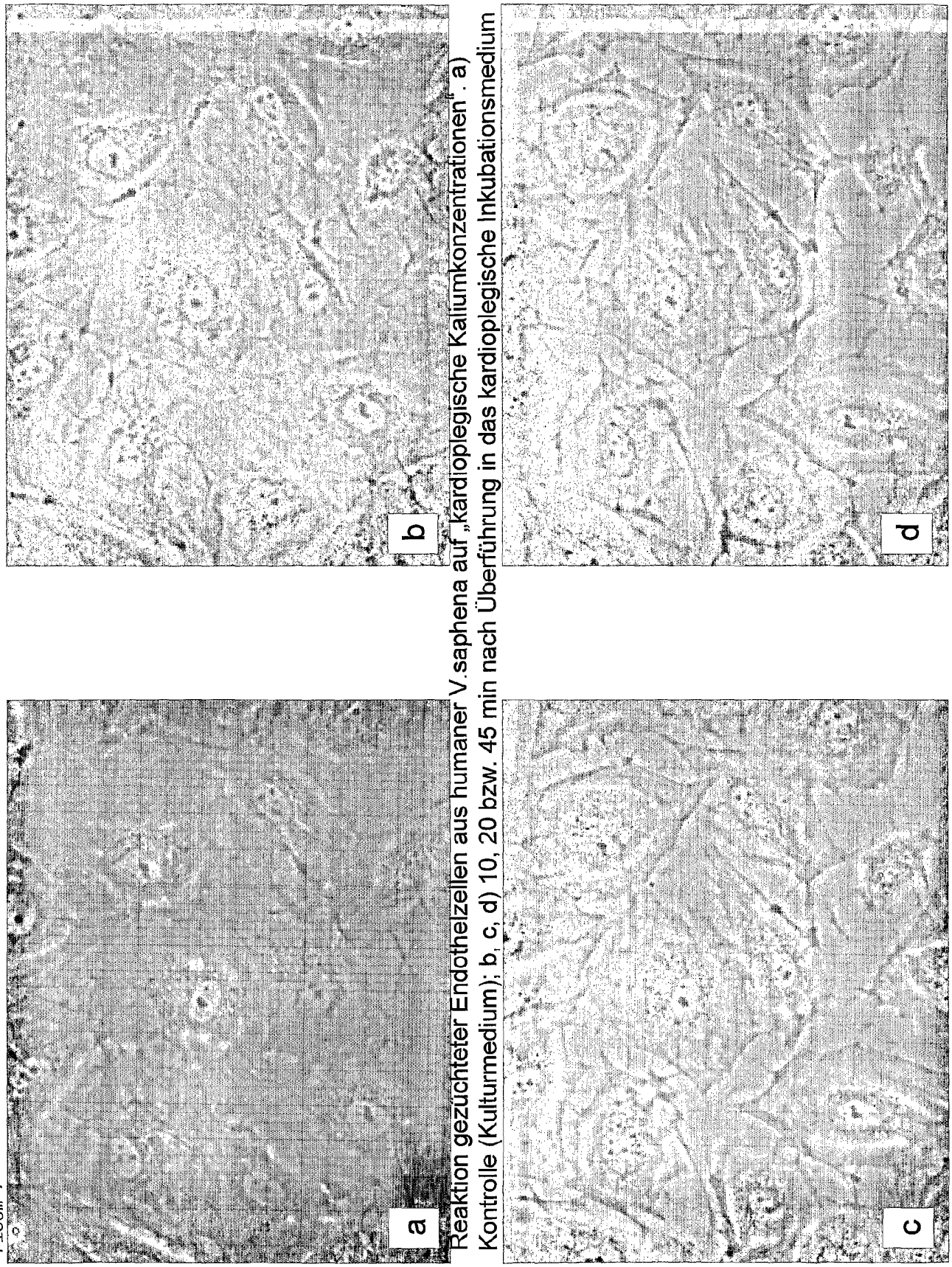
FIGUR 6



Die Integrität eines bei starker Vergrößerung (x630) photographierten Endothelrasens wird durch 100µM Papaverin nicht beeinträchtigt: Oben: Endothelrasen unmittelbar vor Zugabe des Vasodilatators, unten: Zustand 3h nach Zugabe von Papaverin.

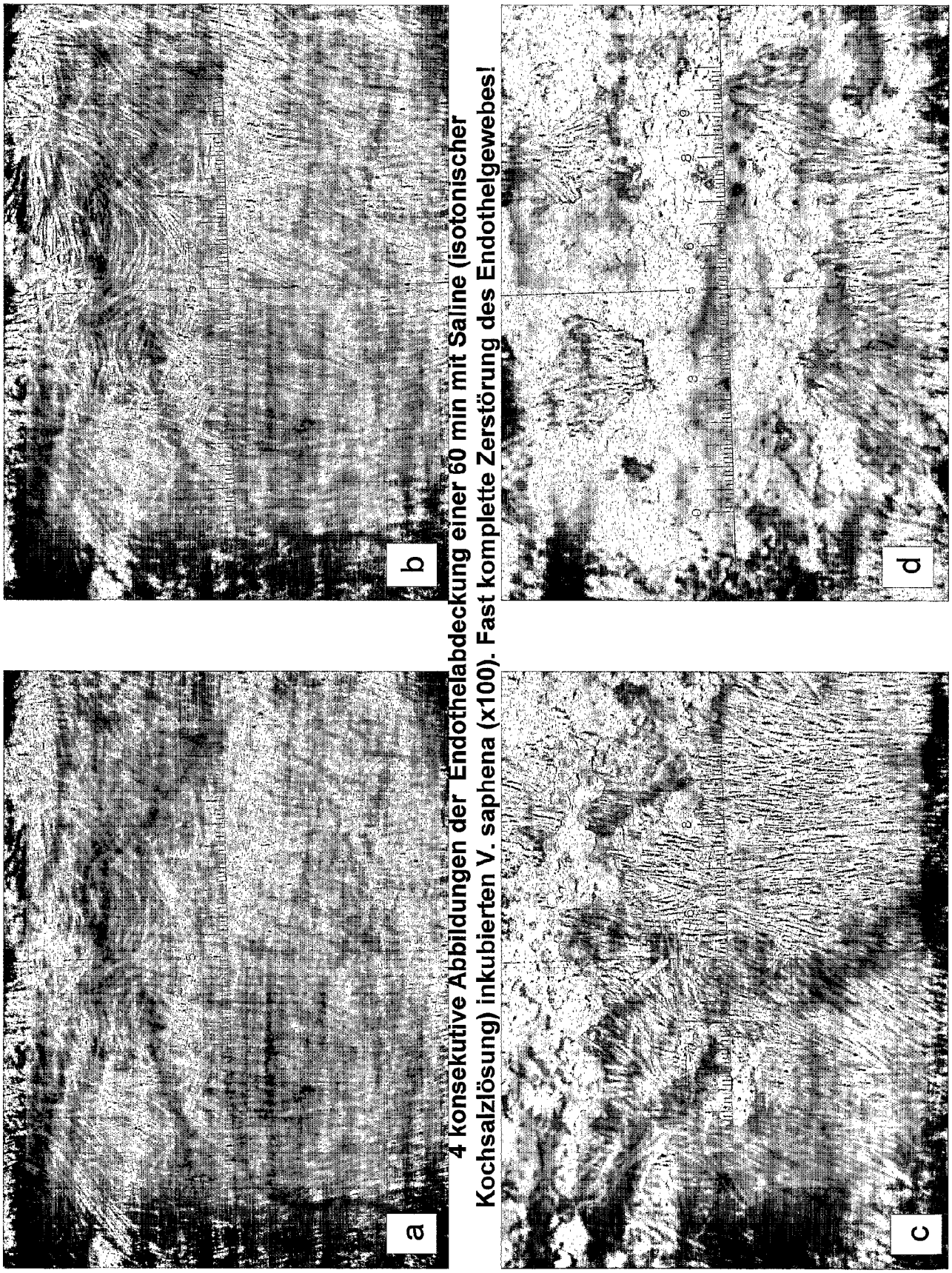


FIGUR 7



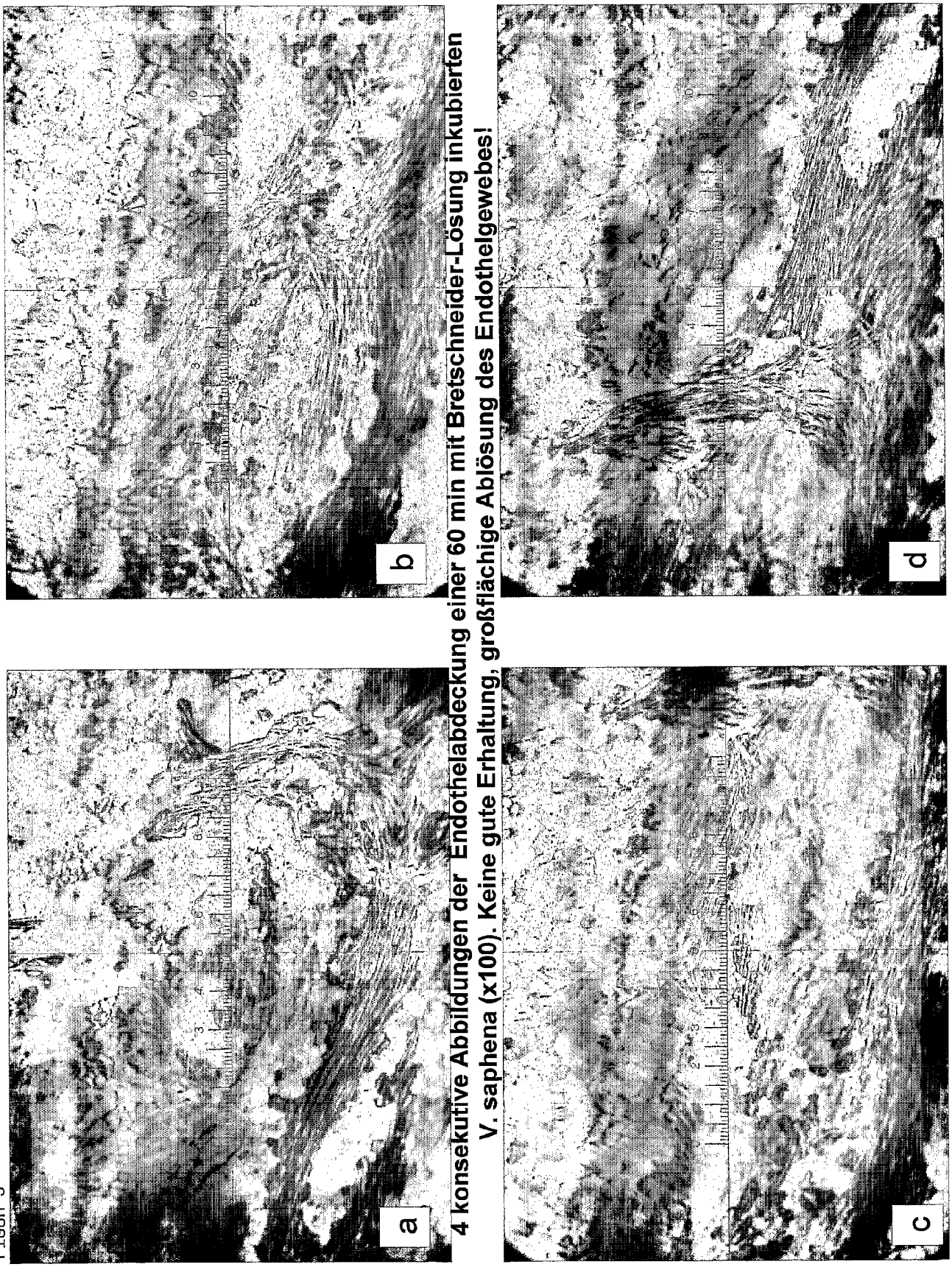
Reaktion gezüchteter Endothelzellen aus humaner V.saphena auf „kardioplegische Kaliumkonzentrationen". a) Kontrolle (Kulturmedium); b, c, d) 10, 20 bzw. 45 min nach Überführung in das kardioplegische Inkubationsmedium

FIGUR 8



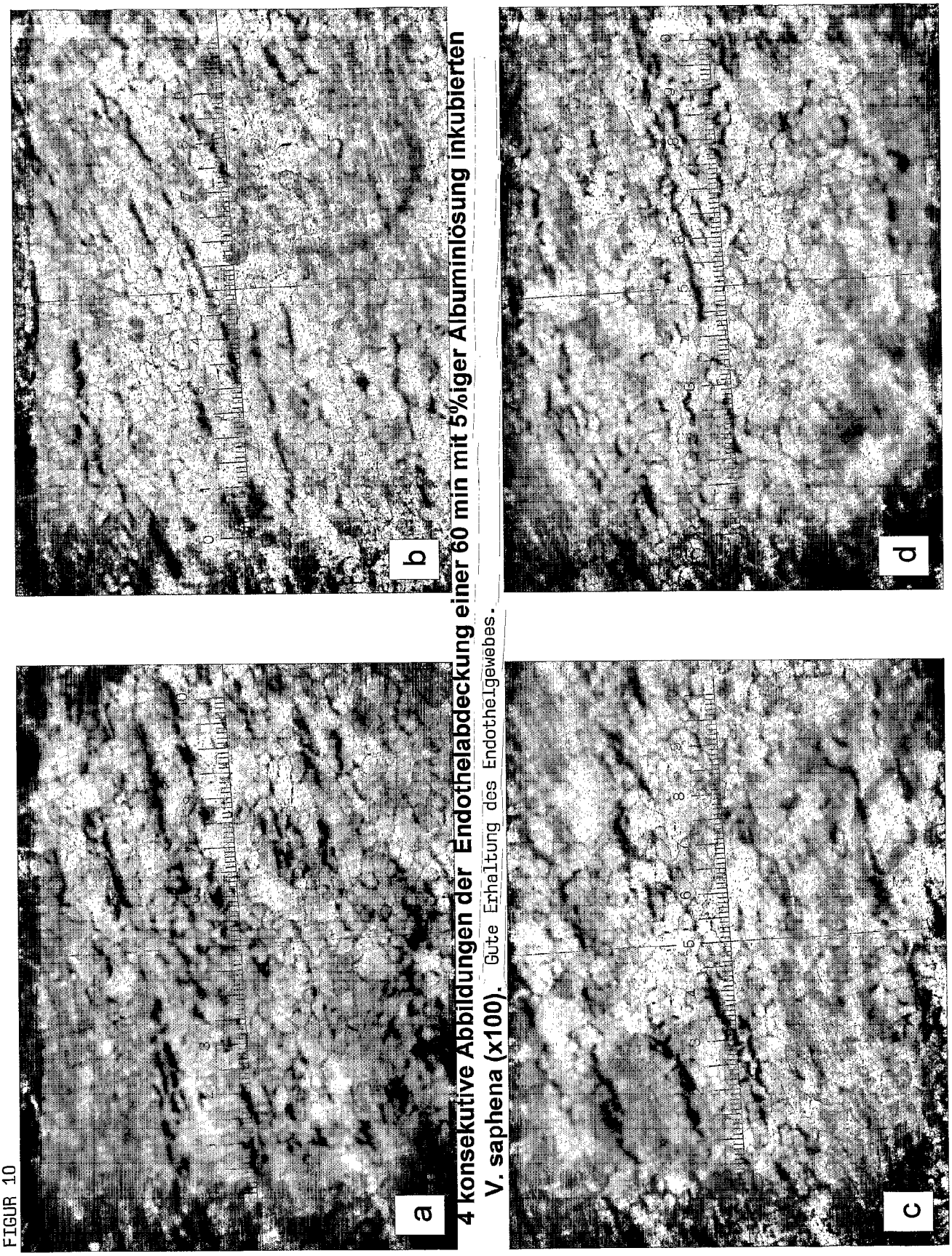
4 konsekutive Abbildungen der Endothelabdeckung einer 60 min mit Saline (isotonischer Kochsalzlösung) inkubierten V. saphena (x100). Fast komplette Zerstörung des Endothelgewebes!

FIGUR 9

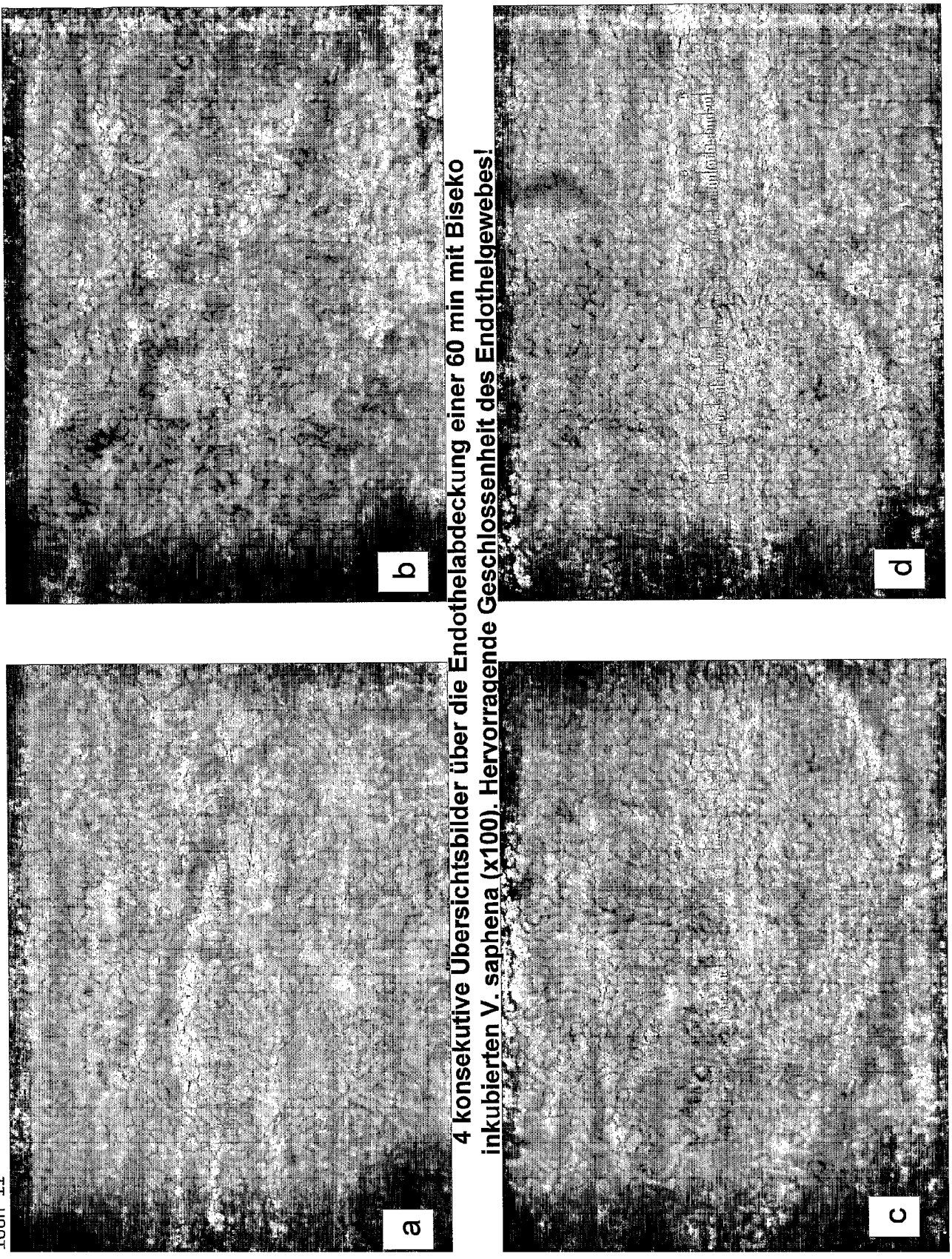


4 konsekutive Abbildungen der Endothelabdeckung einer 60 min mit Bretschneider-Lösung inkubierten V. saphena (x100). Keine gute Erhaltung, großflächige Ablösung des Endothelgewebes!

FIGUR 10



4 konsekutive Abbildungen der Endothelabdeckung einer 60 min mit 5%iger Albuminlösung inkubierten V. saphena (x100). Gute Erhaltung des Endothelgewebes.



FIGUR 11

4 konsekutive Übersichtsbilder über die Endothelabdeckung einer 60 min mit Biseko inkubierten V. saphena (x100). Hervorragende Geschlossenheit des Endothelgewebes!

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter al Application No
PCT/EP2004/006309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A01N1/02 A61B19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A01N A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 599 659 A (CLARKE JOLENE ET AL) 4 February 1997 (1997-02-04) column 1, lines 16-21 column 7, lines 3-50 column 8, line 65 - column 9, line 46 column 11, lines 1-46; table 2 column 13, lines 59-65; examples 4,8 ----- -/--	1-46, 52-54

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 September 2004	08/10/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Klaver, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. C. HAUDENSCHILD, K. E. GOULD, W. C. QUIST & F. W. LOGERFO: "Protection of endothelium in vessel segments excised for grafting" CIRCULATION, vol. 64, no. Supp. II, 1981, pages 101-107, XP009036917 page 101, column 2, paragraph 1 page 104, column 2, paragraph 1 - page 105, paragraph 1 page 105, column 2, paragraph 2 - page 106, paragraph 1	1-46, 52-54
X	WO 02/35929 A (STEEN STIG ; VITROLIFE AB (SE)) 10 May 2002 (2002-05-10) page 4, line 28 - page 5, line 24 page 6, line 30- - page 8, line 31 page 14, lines 21-33 page 16, line 4 - page 17, line 11	1-46, 52-54
X	W. YANG, I. S. BENJAMIN, R. SHERWOOD, J. SALISBURY & B. ALEXANDER: "Effect of perfusate albumin on organ viability and vascular responses in the in vitro dual-perfused rat liver." J. PHARMACOL. TOXICOL. METH., vol. 43, 2000, pages 225-231, XP002297812 page 225, column 1, paragraph 1 page 225, column 2, paragraph 2 - page 226, paragraph 1 page 229, column 2, paragraphs 2,3 page 230, column 2, paragraph 2	1-18,20, 52-54
X	A. ITO, T. HIGASHIGUCHI, M. KITAGAWA, H. YOKOI, T. NOGUCHI & Y. KAWARADA: "Effect of luminal administration of glutamine to suppress preservationb graft injury in small bowel transplants" TRANSPLANT. PROCEED., vol. 27, no. 1, 1995, pages 780-782, XP009036919 page 780, column 1, paragraphs 1,3 page 782, paragraph 2	6,24-46, 52-54
A	WO 03/013239 A (JUCHEM GERD ; LAMM PETER (DE)) 20 February 2003 (2003-02-20) page 10, lines 13-16 page 22, line 18 - page 26, line 29 page 30, lines 9-21; examples 4,5 figures 1,3	1-54
A	GB 2 260 271 A (REGRAGUI IDRISS ABDELLAH) 14 April 1993 (1993-04-14) page 1, paragraphs 1,2; figure 1	47-51

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ial Application No
PCT/EP2004/006309

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 232 659 A (DALE WILLIAM A) 11 November 1980 (1980-11-11) column 1, lines 46-55 column 3, line 41 - column 4, line 22; figure 1 -----	47-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte nal Application No
PCT/EP2004/006309

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5599659	A	04-02-1997	NONE		
WO 0235929	A	10-05-2002	AU	1444302 A	15-05-2002
			CA	2427765 A1	10-05-2002
			CN	1477926 T	25-02-2004
			EP	1339279 A1	03-09-2003
			WO	0235929 A1	10-05-2002
			US	2004029096 A1	12-02-2004
WO 03013239	A	20-02-2003	DE	10138564 A1	27-02-2003
			WO	03013239 A2	20-02-2003
			EP	1414295 A2	06-05-2004
GB 2260271	A	14-04-1993	NONE		
US 4232659	A	11-11-1980	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte ıales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006309

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A01N1/02 A61B19/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A01N A61B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 599 659 A (CLARKE JOLENE ET AL) 4. Februar 1997 (1997-02-04) Spalte 1, Zeilen 16-21 Spalte 7, Zeilen 3-50 Spalte 8, Zeile 65 - Spalte 9, Zeile 46 Spalte 11, Zeilen 1-46; Tabelle 2 Spalte 13, Zeilen 59-65; Beispiele 4,8 -/--	1-46, 52-54

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° *Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen* :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" *Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er*scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, *eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht*
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" *Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum* oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung *kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf* erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und *diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist*
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24. September 2004	08/10/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Klaver, J

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Januar 2004)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	C. C. HAUDENSCHILD, K. E. GOULD, W. C. QUIST & F. W. LOGERFO: "Protection of endothelium in vessel segments excised for grafting" CIRCULATION, Bd. 64, Nr. Supp. II, 1981, Seiten 101-107, XP009036917 Seite 101, Spalte 2, Absatz 1 Seite 104, Spalte 2, Absatz 1 - Seite 105, Absatz 1 Seite 105, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 106, Absatz 1	1-46, 52-54
X	WO 02/35929 A (STEEN STIG ; VITROLIFE AB (SE)) 10. Mai 2002 (2002-05-10) Seite 4, Zeile 28 - Seite 5, Zeile 24 Seite 6, Zeile 30- - Seite 8, Zeile 31 Seite 14, Zeilen 21-33 Seite 16, Zeile 4 - Seite 17, Zeile 11	1-46, 52-54
X	W. YANG, I. S. BENJAMIN, R. SHERWOOD, J. SALISBURY & B. ALEXANDER: "Effect of perfusate albumin on organ viability and vascular responses in the in vitro dual-perfused rat liver." J. PHARMACOL. TOXICOL. METH., Bd. 43, 2000, Seiten 225-231, XP002297812 Seite 225, Spalte 1, Absatz 1 Seite 225, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 226, Absatz 1 Seite 229, Spalte 2, Absätze 2,3 Seite 230, Spalte 2, Absatz 2	1-18,20, 52-54
X	A. ITO, T. HIGASHIGUCHI, M. KITAGAWA, H. YOKOI, T. NOGUCHI & Y. KAWARADA: "Effect of luminal administration of glutamine to suppress preservationb graft injury in small bowel transplants" TRANSPLANT. PROCEED., Bd. 27, Nr. 1, 1995, Seiten 780-782, XP009036919 Seite 780, Spalte 1, Absätze 1,3 Seite 782, Absatz 2	6,24-46, 52-54
A	WO 03/013239 A (JUCHEM GERD ; LAMM PETER (DE)) 20. Februar 2003 (2003-02-20) Seite 10, Zeilen 13-16 Seite 22, Zeile 18 - Seite 26, Zeile 29 Seite 30, Zeilen 9-21; Beispiele 4,5 Abbildungen 1,3	1-54
A	GB 2 260 271 A (REGRAGUI IDRISS ABDELLAH) 14. April 1993 (1993-04-14) Seite 1, Absätze 1,2; Abbildung 1	47-51

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 232 659 A (DALE WILLIAM A) 11. November 1980 (1980-11-11) Spalte 1, Zeilen 46-55 Spalte 3, Zeile 41 - Spalte 4, Zeile 22; Abbildung 1 -----	47-51

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte ales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006309

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5599659	A	04-02-1997	KEINE		
WO 0235929	A	10-05-2002	AU	1444302 A	15-05-2002
			CA	2427765 A1	10-05-2002
			CN	1477926 T	25-02-2004
			EP	1339279 A1	03-09-2003
			WO	0235929 A1	10-05-2002
			US	2004029096 A1	12-02-2004
WO 03013239	A	20-02-2003	DE	10138564 A1	27-02-2003
			WO	03013239 A2	20-02-2003
			EP	1414295 A2	06-05-2004
GB 2260271	A	14-04-1993	KEINE		
US 4232659	A	11-11-1980	KEINE		