



Gefrierkonserviertes Gewebe in der pharmakologischen Forschung

E. Müller-Schweinitzer,

Präklinische Forschung, SANDOZ Pharma A.G., CH-4002 Basel, Switzerland

Zusammenfassung

Pharmakologische Studien zum Wirkungsmechanismus neuer Substanzen werden vorwiegend an frisch entnommenen Geweben verschiedener Tierespezies durchgeführt. Obwohl Humangewebe naturgemäss in der Humanpharmakologie grosse Aussagekraft besitzt, wird dieses nur selten für pharmakologische Untersuchungen verwendet. Der Grund dafür liegt hauptsächlich in der unregelmässigen und meist unvorhersehbaren Verfügbarkeit dieses Gewebes. Im vorliegenden Artikel wird die Brauchbarkeit der Gefriertechnik zur Konservierung isolierter Gewebe für pharmakologische Untersuchungen diskutiert. Die Gefrierkonservierung führt zwar zu einer gewissen Reduktion der Kontraktionskraft, bietet jedoch den Vorteil, vaskuläres und nichtvaskuläres Tier- und Humangewebe zeitlich unbegrenzt zu lagern und für pharmakologische Untersuchungen jederzeit zur Verfügung zu haben. *)

Summary: Cryopreserved Isolated Tissues in Pharmacological Research

Studies on the mechanism of action of drugs are usually performed on freshly obtained tissues from various animal species. Despite its relevance to human pharmacology the use of human isolated tissues in pharmacological experiments is still very much the exception rather than the rule. The major reason for this is the irregular and unpredictable availability of human tissues. This article considers the usefulness of cryopreservation to store vascular and nonvascular mammalian tissues for subsequent pharmacological studies. Despite certain problems, such as diminished contractile force, the technique does offer clear potential for ensuring the supply of both vascular and nonvascular tissues from animal and man for pharmacological studies.

Einleitung

Pharmakologische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus neuer Substanzen werden vorwiegend an frisch entnommenen isolierten Organen verschiedener Tierespezies durchgeführt. Die Übertragbarkeit der in diesen Modellen erhobenen Befunde auf den Menschen wird jedoch häufig in Frage gestellt, sodass die Verwendung von Humangewebe vorzuziehen

*) Diese Methode wurde 1986 mit dem Forschungspreis des Deutschen Bundesministeriums für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit zur Einschränkung und zum Ersatz von Tierversuchen ausgezeichnet.

wäre. Dennoch findet dieses in der pharmakologischen Forschung eher selten Verwendung, obgleich es durch Biopsien, während chirurgischer Eingriffe oder Autopsien relativ einfach gewonnen werden kann. Dies hat verschiedene Gründe: (1) Die mit Humangewebe erhobenen Befunde weisen oftmals eine grosse Variabilität auf, was auf unterschiedliches Alter und Geschlecht der Patienten, Krankheit(en), pathologische Veränderungen der Gewebe, medikamentöse Therapie, Anaesthesie und chirurgisch bedingte Schäden der Gewebe zurückzuführen ist. (2) Ein weiteres und sicher grösseres Problem besteht darin, dass für in vitro-Studien frisches Gewebe erforderlich, Humangewebe aber nur unregelmässig und dann meist zu ungünstigen Zeiten verfügbar ist. Die Vorteile, isolierte Gewebe gefrierkonserviert zeitlich unbegrenzt lagern zu können und damit für pharmakologische Untersuchungen jederzeit verfügbar zu haben, sind daher klar ersichtlich.

Das Einfrieren lebender Zellen führt normalerweise zur Bildung von intra- und extrazellulären Eiskristallen, welche die Zellmembran zerstören, sodass kaum Zellen überleben. Vor mehr als 40 Jahren wurde erstmals publiziert, dass ein Zusatz von Glycerol zur Nährlösung lebende Zellen und kontraktile Proteine vor Schäden während des Gefriervorganges zu schützen vermag [1,2]. Zehn Jahre später wurde die kryoprotektive Aktivität von Dimethylsulfoxid (DMSO) entdeckt [3]. Die Wirkung kryoprotektiver Substanzen besteht darin, dass sie die Bildung von Eiskristallen reduzieren und dadurch die Überlebensrate von Zellen während des Gefriervorganges erhöhen [4]. Dimethylsulfoxid zählt heute zu den am häufigsten verwendeten kryoprotektiven Substanzen bei der Gefrierkonservierung lebender Zellen und Gewebe in verschiedenen Forschungsbereichen, wie der Fertilitäts- und Reproduktionsmedizin, der Zell- und Gewebstransplantation und der Gefässersatzchirurgie. Erste funktionelle Studien zur Gefrierkonservierung isolierter Organe erfolgten an Geweben des Uterus (Gebärmutter) und der *Taenia coli* (Längsmuskelstreifen des Dickdarms) von Meerschweinchen.

In Anlehnung an die in der Zellbiologie verwendeten Kulturmedien wurden in diesen Studien die Organe in physiologischer Nährlösung, welcher 10-15% Glycerol oder DMSO zugesetzt war, eingefroren. Dabei zeigte sich, dass durch langsames Abkühlen in Gegenwart von Glycerol oder DMSO

die Überlebensrate der glatten Muskelzellen, gemessen an ihrer Funktion, deutlich erhöht wird [5,6,7,8,9,10,11,12]. Es zeigte sich aber auch, dass verschiedene Zellarten auf den Gefriervorgang und das jeweils verwendete Gefriermedium nicht nur unterschiedlich reagieren, sondern sogar irreversibel geschädigt werden können. So reagiert die Aorta der Katze bei 37° C auf die Zugabe von 10% DMSO mit Kontraktion [13], während die Aorta von Kaninchen [14] und verschiedene Hundevenen [15] relaxieren. In isolierten Geweben von Uterus und *Taenia coli* des Meerschweinchens und auch in Hundevenen kann DMSO in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration und Temperatur zu Funktionseinbußen führen, welche selbst nach wiederholtem Auswaschen bestehen bleiben [5,6,9,15].

Das gleichzeitige Vorhandensein verschiedenartiger Zelltypen innerhalb eines Gewebeverbandes bedingt daher, dass eine für alle im selben Gewebe vorhandenen Zellen optimale Gefriermethode nicht existieren kann [4,6]. Voraussetzung für die Brauchbarkeit einer für pharmakologische Forschungszwecke geeigneten Gefriermethode ist jedoch die Erhaltung zahlreicher biochemischer und funktioneller Eigenschaften eines Zellverbandes.

Biochemische und biomechanische Eigenschaften

Vergleichende Untersuchungen zum *Kalziumeinstrom* und den damit verbundenen funktionellen Mechanismen haben gezeigt, dass in Hundevenen, welche in foetalem Kälberserum mit DMSO Zusatz in flüssigem Stickstoff eingefroren gewesen waren, Kalziumaufnahme und funktionelle kalziumabhängige Mechanismen (während Depolarisation oder Aktivierung der α_2 -Adrenozeptoren) weitgehend unverändert sind. In frischen wie auch gefrierkonservierten Geweben fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und der Kontraktion während Stimulation durch Kaliumchlorid oder Guanfacin ohne und in Gegenwart verschiedener Kalziumblocker [16]. Ebenso ist gezeigt worden, dass in gefrierkonservierten Hundevenen [17] und Humanvenen [18] die *Aktivität der Monoaminoxidase* erhalten ist. Das gleiche gilt für die *endogene Prostaglandinsynthese*, welche in gefrierkonservierten Hundevenen unverändert ist [17]. Auch ist die Fähigkeit zur Synthese von Prostacyclin I_2 (PGI_2) in

Gewebe gefrierkonservierter Venen von Hunden [19] und Menschen [20,21], nachgewiesen worden. Signifikant höhere Werte als in frischen Kontrollpräparaten weisen die *Gewebstransaminasen* in gefrierkonservierten Humanvenen auf [20]. Dagegen sind dieselben Enzyme in Hundevenen nach der Gefrierkonservierung eher normal oder reduziert [15].

Die mechanischen Eigenschaften des kollagenen und elastischen Bindegewebes von Hundevenen sind nach der Gefrierkonservierung in Gegenwart von DMSO weitgehend erhalten. So ist nach dem Wiederauftauen die *Kollagensynthese* in Hundevenen, gemessen am ^3H -Prolineinbau in vitro, zu mehr als 40% erhalten [22]. Obgleich nach der Gefrierkonservierung die *Elastizität* von Hundevenen unverändert scheint [22,23], ist unter hämodynamisch arteriellen Bedingungen die Dehnbarkeit der Venenwand um 50% reduziert [19]. Für eine Verminderung der Dehnbarkeit spricht auch die im Vergleich zu frischen Gefäßen deutlich reduzierte Relaxationsfähigkeit von Spiralstreifen der Vena saphena und Basilararterien von Hunden, wenn die Organe einige Wochen bei -70°C aufbewahrt worden waren. Hingegen relaxieren die gleichen Venen nach Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff im Organbad ebenso gut wie Streifen frischer Hundevenen [17]. Es scheint demnach neben einem geeigneten Gefriermedium auch die Aufbewahrungstemperatur für eine optimale Erhaltung der biomechanischen Eigenschaften von Bedeutung zu sein.

Funktion der Endothelzellen

Insbesondere im Zusammenhang mit Gefäßstransplantationen haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Frage der *ex vivo*-Erhaltung der Endothelzellen und ihrer Funktion befasst. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gefrierkonservierter Blutgefäße haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt [15,24,25,26,27,28,29]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass bereits vor der Gefrierkonservierung, d.h. während der Präparation der Blutgefäße, durch Verwendung proteinreicher Nährlösungen und durch Einhaltung optimaler pH und Temperaturverhältnisse eine Schädigung der Endothelzellen weitgehend vermieden werden kann [30,31,32].

Biochemisch kann die Endothelzellfunktion durch den Nachweis der *fibrinolytischen (gerinnungshemmenden)* Aktivität geprüft werden. Die nach der Gefrierkonservierung *in vitro* nachweisbare fibrinolytische Aktivität in Venen von Hunden [28,33] und Menschen [20] korreliert weitgehend mit dem Grad der elektronenmikroskopisch nachweisbaren Läsionen der Endothelzellschicht. Hingegen ist der Nachweis einer ungestörten Prostacyclin I_2 -Synthese kein Beweis für eine intakte Endothelzellfunktion, da bereits das Einfrieren vaskulären Gewebes ohne kryoprotektiven Zusatz die PGI_2 -Synthese nicht nur erhalten sondern sogar signifikant steigern kann [34]. Pharmakologisch kann die Funktion der Endothelzellen durch den Nachweis *endothelabhängiger Relaxationen* im Organbad relativ einfach gezeigt werden [35,36].

Nach der Gefrierkonservierung in einem Medium aus Kälberserum mit einem Zusatz von 1.8 M DMSO bei -70°C sind die durch Acetylcholin auslösbaren endothelabhängigen Relaxationen der Ohrarterie vom Kaninchen nahezu unvermindert nachweisbar [37]. Das gleiche gilt für die durch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und Substanz P auslösbaren endothelabhängigen Relaxationen von Schweine-Koronararterien, welche unter gleichen Bedingungen bei -190°C gelagert worden waren [38]. Hingegen zeigt die Rattenaorta nach dem Gefrierprozess unter gleichen Bedingungen nur noch minimale endothelabhängige Relaxationen auf Acetylcholin [39]. Dies mag speziesbedingt sein, kann aber auch darauf beruhen, dass Endothelzellen von Arterien unterschiedlicher Grösse offenbar verschieden empfindlich auf den Gefrierprozess reagieren [37].

Funktion der adrenergen Nervenendigungen

Einen weiteren wichtigen Zelltyp stellen die adrenergen Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems mit ihren Aufnahmemechanismen für Neurotransmitter in den Blutgefäßen dar. Während die Noradrenalin-verstärkende Wirkung von Cocain bereits einen indirekten Hinweis für die Erhaltung adrenerger Aufnahmemechanismen darstellt [17], ist die durch Feldstimulation auslösbare Freisetzung von ^3H -Noradrenalin [40] ein klarer Beweis für die Erhaltung neuronaler Aufnahmemechanismen in gefrierkonservierten Hundevenen. Ähnliche Befunde sind mit Ohrarterien von

Kaninchen erhoben worden. Kaninchenohrarterien, welche in Kälberserum mit 1.8 M DMSO bei -70°C aufbewahrt worden waren, zeigen nach dem Wiederauftauen auf transmurale Elektrostimulation gleich gute tetrodotoxin-empfindliche Kontraktionen wie frische Präparate [37].

Funktion der glatten Muskelzellen

Die Beeinflussung der Funktion glatter Gefäßmuskelzellen durch den Gefrier- und Auftauprozess ist inzwischen anhand vergleichender Untersuchungen mit zahlreichen Agonisten an frischen und gefrierkonservierten Blutgefäßen mehrerer Tierspezies [15,16,17,37,38,43] und auch an Blutgefäßen von Menschen [18,39,42] quantifiziert worden. Hierbei sind die *Efficacy* (maximale Kontraktionskraft) und die Affinität (der wirksame Konzentrationsbereich, charakterisiert durch die ED_{50} bzw. pD_2 Werte) der verwendeten Agonisten zwei wichtige Parameter. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der bisher durchgeführten Messungen der *Kontraktionskraft* an humanen Blutgefäßen, welche in DMSO-haltigem Kälberserum bei -196°C gefrierkonserviert waren. Je nach Gefäßstyp und Art des verwendeten Agonisten ist die maximale Kontraktionskraft der Gewebe

Tab.1: Maximale Kontraktionen gefrierkonservierter humaner Blutgefäße in Prozent der Maximaleffekte frischer Gewebe.

Blutgefäß	Agonist	Maximaleffekt	Ref.
Vena saphena	5-HT	100%	18
	Noradrenalin	32%	*
Basilararterie	KCl	50%	*
	5-HT	40%	39
Lungenarterie	U 46619	76%	42
	Noradrenalin	68%	*
	Histamin	50%	*
	5-HT	50%	*

* = unveröffentlicht

nach dem Wiederauftauen im Vergleich zu frischen Präparaten mehr oder weniger reduziert.

Substanzen wie Glycerol, N-Methylacetamid, Dimethylacetamid, N-Methylformamid, Dimethylformamid und Polyethylenglycol 400, sind an Hundevenen getestet worden. Nach dem Wiederauftauen war die Kontraktionskraft dieser Venen jedoch im Vergleich zur Kontraktionskraft der unter DMSO-Zusatz konservierten Präparate stets erheblich schwächer [39,40,41].

Nicht nur die Kontraktilität, sondern auch die Mechanismen verschiedener *endothelunabhängiger Relaxationen* auf Substanzen wie Isoprenalin, Forskolin, 3-Isobutyl-1-methylxanthin, Nitroprussid, Atriopeptin III, PGI₂, Aminophyllin, Papaverin und verschiedene Kaliumkanal-Aktivatoren sind nach der Gefrierkonservierung in 1.8 M DMSO-haltiger Lösung erhalten. Dies ist in Studien mit Kaninchen-Ohrarterien [37] Schweine-Koronararterien [38] und Lungenarterien von Menschen [42] gezeigt worden. Im Gegensatz zur teilweise deutlichen Verminderung der funktionellen Effekte auf verschiedene Agonisten, fanden sich stets ausgezeichnete Korrelationen, wenn die an gefrierkonservierten Blutgefäßen ermittelten *Affinitätsparameter* mit den an frischen Geweben bestimmten Werten verglichen wurden [16,17,37,38,39,40]. So ergaben sich für die pD₂-Werte von Tryptaminderivaten an frischen und gefrierkonservierten Basilararterien von Hunden [17] wie auch an der Vena saphena von Menschen [18] hoch signifikante Korrelationen. Darüberhinaus sind die Affinitätsparameter sämtlicher bisher untersuchten Antagonisten (pA₂-bzw. pD'₂-Werte) nach der Gefrierkonservierung unverändert. Das gilt für verschiedene, an Humanvenen gegenüber Noradrenalin und 5-HT getestete Antagonisten [18], wie auch für die an Hundevenen gegen Depolarisation und Guanfacin verwendeten Kalziumblocker [16].

Auch nichtvaskuläres Gewebe eignet sich gut für die Gefrierkonservierung. Intrapulmonale Bronchien, welche bei Tumoroperationen gewonnen wurden, entwickeln nach der Gefrierkonservierung im Organbad einen gleich guten Spontantonus wie frisch verwendete Gewebe und können durch die Gefriertechnik routinemässig zur Prüfung bronchodilatatorisch wirksamer Substanzen eingesetzt werden [39]. Die bisher untersuchten

Arterien von Menschen (Basilar-, Cerebral- und Lungenarterien) erfahren durch die Gefrierkonservierung zwar eine teilweise erhebliche Reduktion der Kontraktionskraft, besitzen jedoch unveränderte Affinitäten für die bisher geprüften pharmakologisch wirksamen Substanzen [39,40,42]. Gefrierkonservierte Lungenarterien von Menschen reagieren auf Vaso-konstriktoren und auf Verbindungen, welche über endothel-unabhängige Mechanismen dilatierend wirken, gleich gut wie frisch verwendete Präparate [42]. Abbildung 1 zeigt eine Korrelation aller bisher an frischen und gefrierkonservierten Humanblutgefäßen bestimmten pD_2 -Werte. Sämtliche Blutgefäße waren in foetalem Kälberserum mit 1.8 M DMSO-Zusatz langsam auf -70°C abgekühlt und dann bis zu 3 Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert worden. Vor der Verwendung waren die Präparate im Wasserbad bei 37°C innerhalb weniger Minuten wieder aufgetaut worden. Zwischen den an frischen und gefrierkonservierten Blutgefäßen ermittelten pD_2 -Werten besteht eine hochsignifikante Korrelation ($P < 0.001$).

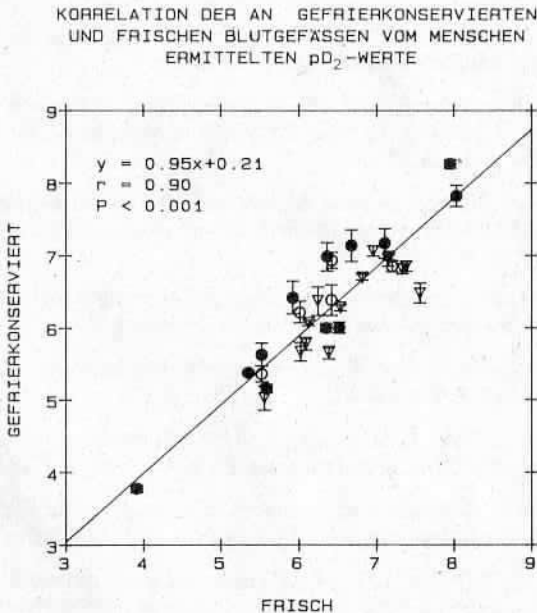


Abb. 1: Korrelation der pD_2 -Werte von Agonisten, welche vergleichend an frischen und gefrierkonservierten Venen (∇), Basilararterien ($\circ$) und Lungenarterien ($\bullet$) von Menschen untersucht worden sind.

Die hier aufgezeigten Befunde unterstreichen die Brauchbarkeit der Gefriertechnik für die Konservierung von Tier- und Humangeweben für pharmakologische Forschungszwecke. In Anbetracht der häufig in Frage gestellten Aussagekraft der mit Tiergeweben erhobenen Befunde für die Humanpharmakologie sollte für in vitro-Experimente, wenn immer möglich, die Verwendung gefrierkonservierten Humangewebes in Erwägung gezogen werden. Der routinemässige Einsatz der Gefrierkonservierung zur Aufbewahrung isolierter Gewebe und die vermehrte Verwendung von Humangewebe in der pharmakologischen Forschung kann somit zur Senkung des Tierverbrauchs beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature London* 164, 666.
2. Szent-Györgyi, A. (1949) Free-energy relations and contraction of actomyosin. *Biol. Bull.* 96, 140-161.
3. Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. H. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394-1395.
4. Pegg, D. E. (1985) Principles of tissue preservation. *Progress in Transplantation*, P.J.Morris and N.L.Tilney (Eds), Churchill Livingstone, Edinburgh-London-Melbourne- New York, pp. 69-105.
5. Farrant, J. (1964) Pharmacological actions and toxicity of dimethyl sulfoxide and other compounds which protect smooth muscle during freezing and thawing. *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 472-483.
6. Farrant, J. (1964) Calcium-dependent contraction of smooth muscle after freezing in the presence of dimethyl sulphoxide. *J. Physiol. (London)* 170, 33P-34P.
7. Farrant, J. (1965) Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature* 205, 1284-1287.
8. Farrant, J., Walter, C. A., & Armstrong, J. A. (1967) Preservation and function of an organized tissue after freezing and thawing. *Proc. Roy. Soc. B (London)* 168, 293-310.
9. Elford, B. C. (1970) Functional recovery of smooth muscle after exposure to dimethyl sulfoxide and low temperatures. *Cryobiology* 7, 148-153.
10. Elford, B. C., & Walter, C. A. (1972) Preservation of structure and function of smooth muscle cooled to -79°C in unfrozen aqueous media. *Nature New Biol.* 236, 58-60.
11. Elford, B. C., & Walter, C. A. (1972) Effects of electrolyte composition and pH on the structure and function of smooth muscle cooled to -79°C in unfrozen media. *Cryobiology* 9, 82-100.

12. Taylor, M. J., & Pegg, D. E. (1983) The effect of ice formation on the function of smooth muscle tissue stored at -21 or -60° C. *Cryobiology* 20, 36-40.
13. Spilker, B. (1972) Pharmacological studies on dimethyl sulfoxide. *Arch. int. Pharmacodyn.* 200, 153-167.
14. Jackson, C. V., Karow, A. M., & Carrier, G. O. (1979) Influence of dimethyl sulfoxide (Me₂SO) on vascular smooth muscle. *Arch. int. Pharmacodyn.* 237, 4-15.
15. Weber, T. R., Dent, D. L., Lindenauer, S. M., Allen, E., Weatherbee, L., Spencer, H. H., & Gleich, P. (1975) Viable vein graft preservation. *J. Surg. Res.* 18, 247-255.
16. Ebeigbe, A. B., Müller-Schweinitzer, E., & Vogel, A. (1988) Effects of calcium channel blockade in canine saphenous veins after storage at -190° C. *Brit. J. Pharmacol.* 94, 381-388.
17. Müller-Schweinitzer, E., & Tapparelli, C. (1986) Pharmacological studies on frozen stored canine saphenous veins and basilar arteries. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332, 74-78.
18. Müller-Schweinitzer, E., Tapparelli, C., & Victorzon, M. (1986) Functional studies on human veins after storage at -190° C. *Brit. J. Pharmacol.* 88, 685-687.
19. Showalter, D., Durham, S., Sheppeck, R., Berceli, S., Greisler, H., Brockman, K., Makaroun, M., Webster, M., Steed, D., Siewers, R., & Borovetz, H. (1989) Cryopreserved venous homografts as vascular conduits in canine carotid arteries. *Surgery (St. Louis)* 106, 652-659.
20. Louagie, Y. A., Legrand-Monsieur, A., Lavenne-Pardonge, E., Remacle, C., Delvaux, P., Maldague, P., Buche, M., Ponlot, R., & Schoevaerds, J.-C. (1990) Viability of long-term cryopreserved human saphenous veins. *J. Cardiovasc. Surg.* 31, 92-100.
21. Passani, S. L., Angelini, G. D., Breckenridge, I. M., & Newby, A. C. (1988) Endothelial function can be preserved during cryo-storage of human saphenous vein. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.* 2, 233-236.
22. Brockbank, K. G. M., Donovan, T. J., Ruby, S. T., Carpenter, J.F., Hagen, P.-O., & Woodley, M. A. (1990) Functional analysis of cryopreserved veins. Preliminary report. *J. Vasc. Surg.* 11, 94-102.
23. L'Italien, G. J., Maloney, R. D., & Abbott, W. M. (1979) The preservation of the mechanical properties of venous allografts by freezing. *J. Surg. Res.* 27, 239-243.
24. Balderman, S. C., Montes, M., Schwartz, K., Hart, T., & Bayana, J. N. (1984) Preparation of venous allografts. A comparison of techniques. *Ann. Surgery (Philadelphia)* 200, 17-130.
25. Boren, C. H., Roon, A. J., & Moore, W. S. (1978) Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation. *Surgery* 83, 382-391.
26. Calhoun, A. D., Baur, G. M., Porter, J. M., Houghton, D. H., & Templeton, J. W. (1977) Fresh and cryopreserved venous allografts in genetically characterized dogs. *J. Surg. Res.* 22, 687-696.
27. Gottlob, R., Stockinger, L., & Gestring, G. F. (1982) Conservation of veins with preservation of viable endothelium. *J. Cardiovasc. Surg.* 23, 109-116.



28. Malone, J. M., Moore, W. S., Kischer, C. W., Keown, K., & Conine, R. (1980) Venous cryopreservation: Endothelial fibrinolytic activity and histology. *J. Surg. Res.* 29, 209-222.
29. Weber, T. R., Lindenauer, S. M., Dent, T. L., Allen, E., Salles, C. A., & Weatherbee, L. (1976) Long-term patency of vein grafts preserved in liquid nitrogen in dimethyl sulfoxide. *Ann. Surg.* 184, 709-712.
30. Stanley, J. C., Sottiurai, V., Fry, R. E., & Fry, W. J. (1975) Comparative evaluation of vein graft preparation media: electron and light microscopic studies. *J. Surg. Res.* 18, 235-246.
31. Haudenschild, C. C., Gould, K. E., Quist, W. C., & Logerfo, F. W. (1981) Protection of endothelium in vessel segments excised for grafting. *Circulation* 6,II/102-II/107.
32. Brockbank, K. G. M., Bank, H. L., & Schmehl, M. (1989) Ischemia and saphenous vein endothelial integrity. *Transplantation Proc.* 21, 1384-1388.
33. Sachs, S. M., Ricotta, J. J., Scott, D. E., & De Weese, J. A. (1982) Endothelial integrity after venous cryopreservation. *J. Surg. Res.* 32, 218-227.
34. Ts'ao, C., Ng, A. S., & Holly, C. M. (1978) Increased productivity of PGI₂-like activity by frozen-thawed rat aorta. *Prostaglandins* 16, 503-512.
35. Furchgott, R. F. (1981) The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. *TIPS* 2, 173-175.
36. Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
37. Thompson, L., Duckworth, J., & Bevan, J. (1989) Cryopreservation of innervation, endothelial and vascular smooth muscle function of a rabbit muscular and resistance artery. *Blood Vessels* 26, 157-164.
38. Schoeffter, P., & Müller-Schweinitzer, E. (1990) The preservation of functional activity of smooth muscle and endothelium in pig coronary arteries after storage at -190° C. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 646-651.
39. Müller-Schweinitzer, E. (1988) Cryopreservation: a useful technique for storing tissues for pharmacological investigations. *TIPS* 9, 221-223.
40. Müller-Schweinitzer, E., & Tapparelli, C. (1987) Cryopreservation of isolated blood vessels for pharmacological studies: experiments on canine and human veins. In: *Neuronal Messengers in Vascular Function*, A. Nobin, C. Owman and B. Arneklö-Nobin (Eds.), Elsevier Science Publishers (Biomedical Division), Amsterdam pp. 105-110.
41. Müller-Schweinitzer, E. (1988) Cryopreservation of isolated blood vessels. *Folia Haematol. (Leipzig)* 115, 405-410.
42. Ellis, P., & Müller-Schweinitzer, E. (1991) Maintenance of functional activity of human pulmonary arteries after cryopreservation. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1377-1380.
43. Dent, T. L., Weber, T. R., Lindenauer, S. M., Ascher, N., Weatherbee, L., Allen, E. & Spencer, H. H. (1974) Cryopreservation of vein grafts. *Surg. Forum (Philadelphia)* 25, 241-243.

...UND DU WÜRDST SICHER-
STELLEN, DASS MAN DEINE
KALBSLEBER PORTIONEN
NIEMALS MIT DEN
MEERSCHWEINCHENDÄRHMEN
VERWECHSELN KANN !!.

KÖNIG

