

Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
(Nordwestdeutsche Kieferklinik)

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Schmelzle
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Universität Hamburg

Darstellung von eNOS und CD34 (Endothelin)
als Parameter von Endothelregeneration bei autologen
Gefäßinterponaten der Arteria carotis der Wistar-Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

vorgelegt von
Erik Timendorfer
aus Celle

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 12.04.2010

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. U. Wehrenberg

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung und Zielsetzung	5
Entwicklung und Anwendung der Mikrovaskularchirurgie.....	5
Anwendung der Mikrovaskularchirurgie.....	5
Histologie der Arterien.....	5
Mikrovaskuläre Nahttechniken:.....	6
Histopathologie der Anastomose:.....	6
Immunhistochemie Grundlagen:.....	7
Merkmale und Funktion der Zielantigene:.....	8
eNOS:.....	8
CD34 (Endothelin):.....	8
Zielsetzung:.....	9
Material und Methoden	10
Herkunft der Präparate.....	10
Immunhistochemische Färbungen.....	10
Grundlagen der Färbung.....	12
Auswertung und Dokumentation.....	13
Ergebnisse	15
Immunhistochemische Färbungen:.....	15
eNOS:	15
CD34 (Endothelin):.....	23
Zeitliche Darstellung:.....	32
Diskussion	33
eNOS:.....	33
CD34 (Endothelin):.....	34
Zusammenfassung	36
Einleitung:.....	36
Material und Methode:.....	36
Erwartete Ergebnisse:.....	36

Erwartete Schlußfolgerung:.....	36
Literaturverzeichnis.....	37
Danksagung.....	41
Lebenslauf.....	42
Erklärung.....	43

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Entwicklung und Anwendung der Mikrovaskularchirurgie

Die Mikrochirurgie ist eine spezielle Technik der Chirurgie, bei der Operationsmikroskope angewandt werden, wenn das bloße Auge zum Erkennen der zu operierenden Strukturen, wie Gefäßen oder Nerven nicht ausreicht. 1921 wurde von Carl-Olof NYLEN erstmals ein solches Mikroskop eingesetzt. Im Jahre 1953 legte Carl Zeiss mit dem OPMI 1 den Grundstein für die mikroskop-gestützte HNO-Chirurgie (LITTMANN H, 1954). Eine zweite Optik wurde 1970 hinzugefügt, die es einem Assistenten ermöglichte der Operation visuell zu folgen (O'BRIEN, 1970). Seitdem verbesserte sich die Technik kontinuierlich und ermöglicht bis zu 40-fache Vergrößerung.

Anwendung der Mikrovaskularchirurgie

Die Mikrochirurgie wird in der rekonstruktiven Chirurgie hauptsächlich zur Präparation von Gefäßen und Nerven verwendet, welche häufig einen Durchmesser von nur 0,5mm nicht überschreiten. Seit den 60er Jahren können abgetrennte Extremitäten mikrochirurgisch erfolgreich replantiert werden.

Außerdem sind Transplantationen körpereigenen Gewebes möglich, zum Beispiel Muskelgewebe oder Haut-Unterhautgewebe zur Deckung von unfallbedingten Defekten oder nach Tumorsektionen. So lässt sich eine einseitige Lähmung der mimischen Muskeln durch N. Facialis-Ausfall der entsprechenden Seite und die daraus resultierenden ästhetischen und funktionellen Schäden durch mikrochirurgische Transplantation von körpereigenen Nerven und Muskeln, welche an die gesunde Körperhälfte anastomosiert werden beheben.

1962 gelang Malt und McKhann erstmals die erfolgreiche Replantation eines Armes bei einem 12-jährigen Jungen (MALT RA, 1964). Ein vollständig abgetrennter Daumen wurde 1965 zum ersten Mal unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischen Techniken replantiert (S KOMATSU, S TAMAI ,1954).

Histologie der Arterien

Arterien weisen typischerweise einen dreischichtigen Wandaufbau auf. Die dem Lumen zugewandte Schicht, die Tunica interna (Interna) ist mit einer einzelligen Endothellage ausgeklei-

det. Darunter befindet sich eine Bindegewebsschicht und die Membrana elastica interna. Darauf folgt die Tunica media (Media), welche je nach Größe und Druckverhältnissen innerhalb des Gefäßes eine unterschiedlich dicke Schicht an glatter Muskulatur aufweist. Das elastische Gerüst der Media besteht aus Bindegewebe mit elastischen Fasern, Vasa Vasorum und einem perivaskulären Nervenplexus (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991, BARGMANN 1951).

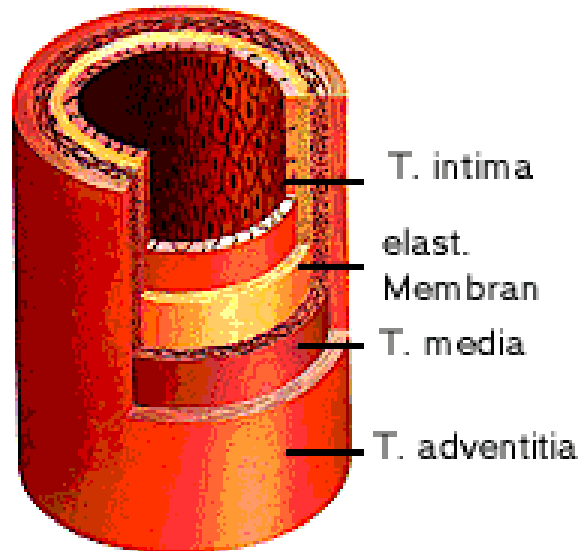


ABB 1: Bau der Arterienwand

Mikrovaskuläre Nahttechniken:

Gegenüber stellen lassen sich hier die Biangulation zweier Haltefäden im 180°-Winkel mit fortlaufender Naht (JH JACOBSEN, EL SUAREZ 1960) und die Versorgung der Anastomose mittels Einzelkopfnähten (JR COBBETT, 1967). Ziel ist immer die Durchgängigkeit des Gefäßes zu erhalten. Eine spannungslose Adaptation der Gefäßwände ist anzustreben (HÖLTJE & SCHWIPPER 1983, HAYHURST & O'BRIEN 1975). Viele weitere Nahttechniken konnten sich entweder nicht durchsetzen oder sind Detailverbesserungen der oben genannten. In einer vergleichenden Studie 1990 konnte nachgewiesen werden, dass die Qualität der Anastomosen weniger von der Nahttechnik abhängt, als von den operative Fähigkeiten des Operateurs (A GUILTY et al. 1990).

Histopathologie der Anastomose:

Die Beobachtungen betreffen direkte mikrovaskuläre End-zu-End-Anastomosen an Arterien mit Durchmessern um 1mm. Während verschiedener Entnahmezeitpunkte, bis zu 18 Wochen postoperativ (BAXTER et al. 1972) wurden folgende Veränderungen beobachtet:

Bereits Stunden nach der Anastomisierung zeigt sich eine langstreckige Intimaendothel- und partielle Medianekrose. Auf dem freiliegenden subendothelialen Bindegewebe zeigen sich nach 12 Stunden Ansammlungen von Thrombozyten (MINDERJAHN 1979). Zwischen den Gefäßstümpfen befindet sich ein Koagulum, darüber schränkt ein muraler Thrombus leicht das Lumen ein. Ab der zweiten Woche schrumpft dieser und es lassen sich glatte Muskelzellen, Elastin- und Kollagenfibrillen darin nachweisen (O'BRIEN 1977). Erste Endothelproliferationen lassen sich nach zwei Tagen beobachten.(MINDERJAHN 1979). Die Endothelregeneration der Intima erfolgt nach 5-10 Tagen (VAN GELDER 1979, MEYERMANN et al. 1979, THURSTON et al. 1976), bzw. nach 7-14 Tagen (MINDERJAHN 1979, RIEDIGER & SCHLOTE 1981), abhängig von der Ausdehnung und Schwere des Defekts. Infolge unvermeidlicher Unterbrechungen der Membrana elastica interna kommt es zu einer hyperplastischen Antwort von Mediakomponenten, genannt myointimale oder subintimale Hyperplasie. Nach 4-8 Wochen ist die Anastomose organisiert (ACLAND & TRACHTENBERG 1977, BAXTER et al. 1972). Für Gefäßverschlüssen sind Thrombosen oder mechanische Flußstörungen die Hauptursachen. Die Mehrzahl der Thrombosen findet in den ersten 72 Stunden statt (HAYHURST & O'BRIEN 1975).

Immunhistochemie Grundlagen:

Die Immunhistochemie hat das Ziel bestimmte Gewebestrukturen durch die Affinität zwischen Antikörper und Antigen nachweisbar zu machen. Der Primärantikörper sollte eine hohe Affinität und Spezifität gegen das Ziel-Epitop haben. Man unterscheidet hierbei die direkte von der indirekten Methode. Bei der Direkten erfolgt die Färbung über Enzym-konjugierte-Antikörper. Bei der indirekten Methode kommt ein Enzym-markierter Sekundärantikörper zum Einsatz, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Hierdurch wurde eine Sensitivitätssteigerung erreicht. Bei der Drei-Schritt-Methode, einer weiteren Verfeinerung der indirekten Immunhistochemie wird ein tertiärer Antikörper verwendet. Dieser bindet an den Sekundärantikörper. Dieser Schritt dient der Signalverstärkung und ist sinnvoll, wenn eine geringe Menge an Epitop dargestellt werden soll.

Die ABC – Methode (Avidin Biotin Complex) beruht auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin und erreicht eine weitere Sensitivitätssteigerung. Der unmarkierte Primärantikörper bindet an das Antigen. Der Sekundärantikörper ist mit Biotin markiert und der dritte Schritt

schließlich ist ein Avidin-Biotin Peroxidase Complex, der dann sichtbar gemacht werden kann.

Merkmale und Funktion der Zielantigene:

eNOS:

Die Nitrit Oxid Synthase (NOS) katalysiert die Synthese von Stickoxid (NO), einem kurzlebigen Radikal, das bei der Signalübertragung im Rahmen der Vasorelaxation und Neurotransmission eine Rolle spielt. Die endotheliale NOS (eNOS) hat Rezeptoren für NADPH, FAD, FMN und Calmodulin. Bei der Antikörperfärbung gegen die endotheliale Stickoxid Synthase erscheinen die Endothelzellen schwarz gefärbt.

Abbildung 2. zeigt eine intakte Endothelschicht an einer nicht vorbehandelten Arterie, während Abbildung 3 eine weitgehend zerstörte Endothelschicht an einem Gefäß zeigt, welches 24 Stunden nach der Operation entnommen wurde.

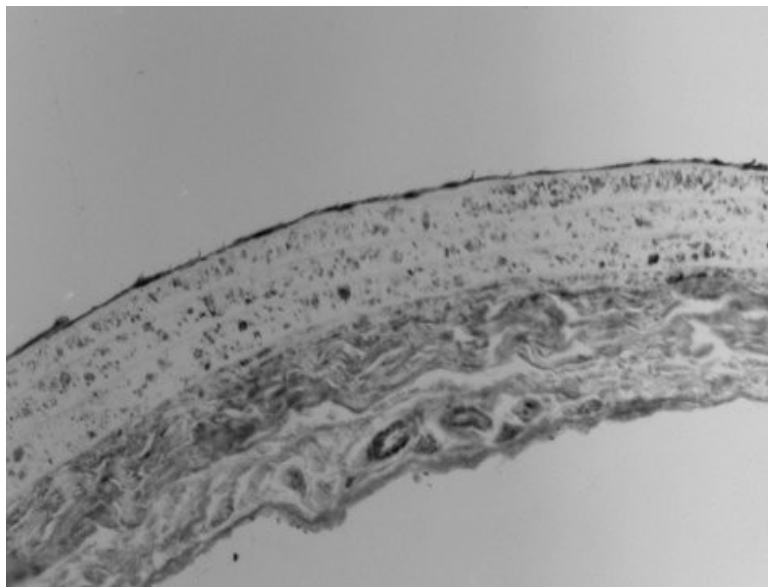


ABB 2: Intaktes Endothel an einer unvorbehandelten Arterie (AB11/9 - 1:500 – 20x0.6)

CD34:

Das CD34 Antigen ist ein einzelkettiges membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110kD. Es ist auf unreifen humanen lymphoiden und myeloiden hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Das Antigen wird außerdem auf Kapillarendothelien gebildet. Es spielt eine Rolle bei der Identifikation von Gefäßtumoren und bei der Charakterisierung von Leukämien.

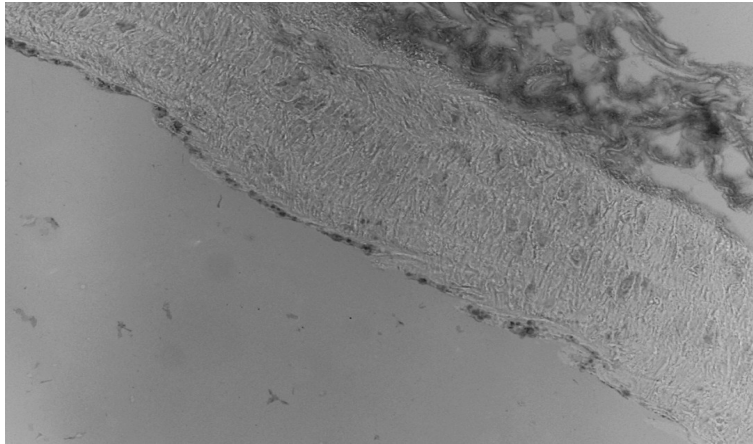


ABB 3: Intakte Endothelschicht (AB11/8)

Zielsetzung:

Diese Arbeit soll die Endothelregeneration an mikrochirurgischen Anastomosen beobachten und ihren Verlauf dokumentieren. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Langzeitbeobachtung gerichtet werden. Viele ähnliche Versuchsreihen der letzten Jahrzehnte wurden nur einige Wochen durchgeführt. Gibt es weitere Veränderungen der Anastomosen nach 6 Monaten? Woher kommen die regenerierten Endothelzellen? Hierbei werden vier Ansätze diskutiert:

- aus ortsständigen peripheren Endothelzellen (THURSTON et al. 1976, MINDERJAHN 1983)
- aus zirkulierenden Blutzellen (HAUDENSCHILD & STUDER 1971)
- aus glatten Muskelzellen (MITCHELL et al. 1996)
- aus anderen undifferenzierten Zellen (AUERBACH 1991)

Ziel dieser Arbeit ist es diese Frage während eines 6 - monatigen Beobachtungszeitraumes zu beleuchten.

MATERIAL UND METHODEN

Herkunft der Präparate

Die Präparate wurden mir von Herrn Dr. Dr. Arnd Bartnick übergeben, welcher sie im Rahmen seiner Dissertation im folgendem Verfahren hergestellt hat. Insgesamt handelte es sich um 184 Objektträger mit je 3 Schnitten.

Es wurde die Arteria carotis communis der Wistar Ratte mit ihrer Bifurkation zur Arteria carotis externa und interna ausgewählt und bei insgesamt 70 Tieren entnommen. Dieser Operation ging eine weitere Operation voraus, während der ein 3-4 mm langes Stück der Arteria carotis communis entnommen und um 180° gedreht wieder eingesetzt wurde. Die Ratten wurden in sieben Gruppen eingeteilt, welche aus je 10 Tieren bestanden und sich in der Zeit zwischen 1. Operation und Entnahme des Gefäßes unterschieden (siehe Tabelle 1).

TAB 1: Postoperative Nachbeobachtungsintervalle

Gruppe	Postoperatives Nachbeobachtungsintervall	Anzahl der Tiere
1	Ohne Nachbeobachtungszeit	10
2	8 Stunden	10
3	24 Stunden	10
4	3 Tage	10
5	8 Tage	10
6	28 Tage	10
7	6 Monate	10

Immunhistochemische Färbungen

Alle verwendeten Präparate waren formalinfixiert und paraffineingebettet. In Vorversuchen an drei unveränderten Gefäßen, sowie an 6 Gefäßen von zuvor operierten Tieren aus zwei verschiedenen Gruppen und Kontrollorganen wurde die Eignung der Antikörper zur Identifizierung der Zielantigene im Rattengewebe untersucht, das entsprechende Detektionssystem wurde ausgewählt, die optimalen Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten wurden festgelegt. Letztendlich kamen als Detektionssysteme Endothelial Cell Marker CD34 (NOVOCASTRA Laboratories Ltd, UK) in einer Konzentration von [1:200] und eNOS/NOS

Type III (BD Biosciences) in einer Konzentration von [1:500] zur Anwendung. Die Färbungen liefen standardisiert nach einem Protokoll ab. (Tabelle 2)

TAB 2: Protokoll für „eNOS“ und „CD34“

1. Tag -Vorbehandlung:	
Xylolersatz	3 x 5 min
100 % Äthanol	5 min
96 % Äthanol	5 min
80 % Äthanol	5 min
70 % Äthanol	5 min
Aqua dest.	5 min
PBS	15 min
2 % NRS/PBS	30 min
primärer Antikörper: Inkubation: über Nacht bei 4°C, Verdünnungspuffer: PBS + 0,2%BSA + 0,1%NaN ₃	
2. Tag	
PBS	3 x 10 min
anti mouse IgG-biotin (rabbit) 1:250	60 min
PBS	2 x 10 min
Mouse-PAP 1:100	30 min
PBS	2 x 10 min
ABC-Komplex 1:250	30 min
PBS	10 min
PB 0,1M ph 7,4	10 min
Entwicklung der Peroxidase-Aktivität <ul style="list-style-type: none"> • 45 ml PB 0,1 M ph 7,4 • 1 ml DAB (22,5 mg/ml) • 100 µl Ammoniumchlorid (18 mg/100µl) • 900 µl Nickelsulfat (0,05 M) • 900 µl Glucose (10 %) • 150 µl Glucose Oxidase (1,2 mg/1 ml Aqua dest.) 	20 – 30 min
PBS	3 x 5 min
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken in Eukitt	

TAB 3: Herkunft und Art der verwendeten Antikörper

Antikörper	Produkt-Nr.	Zielantigen	Verdünnung	Quelle
ENOS/NOS Type III	610296	Endothel	1 :500	BD Biosciences
Endothelial Cell Marker (CD34)	NCL-END	Endothel	1:200	Novocastra Laboratories Ltd.

Grundlagen der Färbung

Als Färbung kam eine Kombination der PAP (Peroxidase Anti Peroxidase) - und der ABC (Avidin Biotin Peroxidase Complex) Technik zum Einsatz. Im Vergleich zu immun-histochemischen Standardfärbungen lässt sich bei diesem Verfahren eine signifikant stärkere Färbung beobachten.

Diese Färbung lässt sich in vier, oder falls nötig, in sechs Schritten durchführen (Abbildung 4). Der erste Schritt besteht dabei darin, den Schnitt mit dem primären monoklonalen Antikörper zu inkubieren. Während des zweiten Schrittes wird anti-mouse oder anti-rat IgG-biotin, während des dritten monoklonaler PAP Komplex hinzugegeben. Der ABC-Complex folgt dann im vierten Schritt. Bei der sechsstufigen Variante werden die Schritte zwei und drei wiederholt. In diesem Versuch wurde die Methode in vier Schritten angewandt.

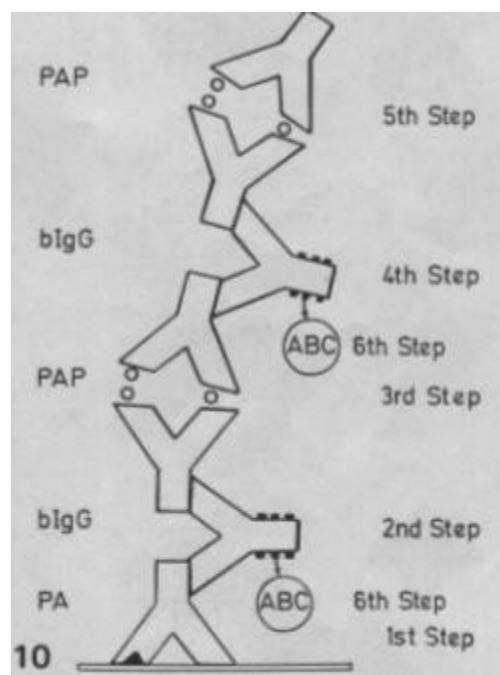


ABB 4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der PAP-ABC Kombinationsmethode

Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung erfolgte mittels eines Mikroskopes (Typ Axioskop 2, Fa. Zeiss) welches die Möglichkeit der Aufnahme von Bildern über eine digitale Kamera (Typ AxioCam HRc, Fa. Zeiss) bot. (Abbildung 5)



ABB 5: Mikroskop zur Auswertung

Jeder Gefäßlängsschnitt besitzt vier zu beurteilende Anastomosen. Bei sieben Gruppen zu je 10 Tieren, also 70 Gefäßen ergeben sich somit 280 zu beurteilende Anastomosen. Jedes Gefäß wurde zusätzlich am distalen und proximalen Anteil jeder Anastomose und im Mittelteil des Interponates beurteilt (siehe Abb. 6). Es ergaben sich so sieben verschiedene Stellen auf jeder Gefäßseite. Bei Vorhandensein mehrerer Färbungen desselben Gefäßes mit demselben Antikörper wurde das Präparat mit der besseren Struktur und Färbung ausgewählt. Trotzdem ließen sich einige Gefäße, insbesondere wegen schlecht erhaltener Struktur nach Andauern, im Ganzen oder zum Teil nicht beurteilen. Beurteilt wurde an den genannten Stellen das Vorhandensein von Endothelzellen als Ja / Nein – Entscheidung.

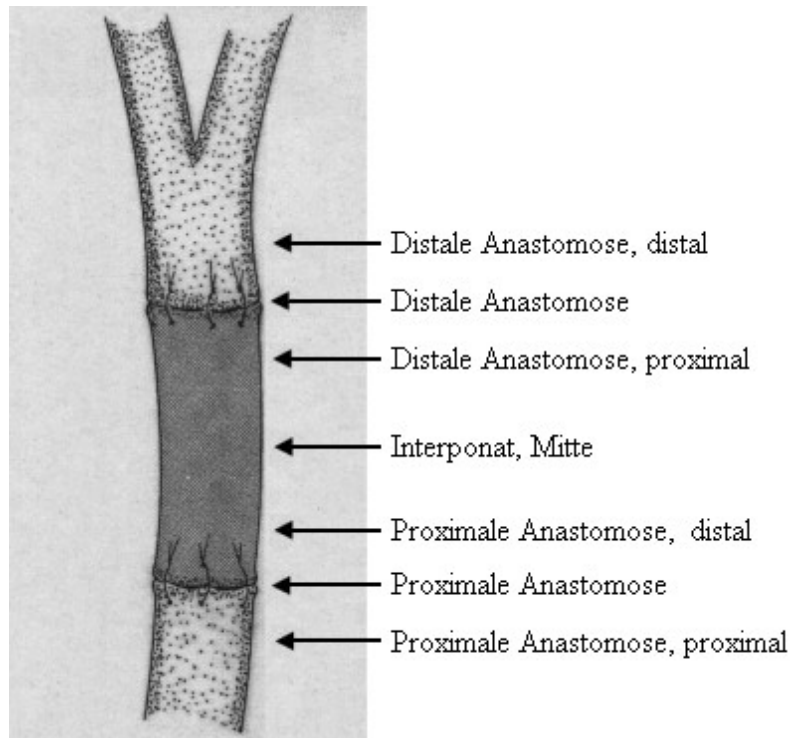


ABB 6: Schematisch dargestelltes Gefäß mit Anastomose und eingezeichneten Auswertungspunkten

ERGEBNISSE

Immunhistochemische Färbungen:

eNOS:

Abbildung 7. zeigt eine intakte Endothelschicht an einer nicht vorbehandelten Arterie, während Abbildung 8 eine weitgehend zerstörte Endothelschicht an einem Gefäß zeigt, welches 24 Stunden nach der Operation entnommen wurde. Deutlich ist die Stauchung des Gefäßes zu erkennen.

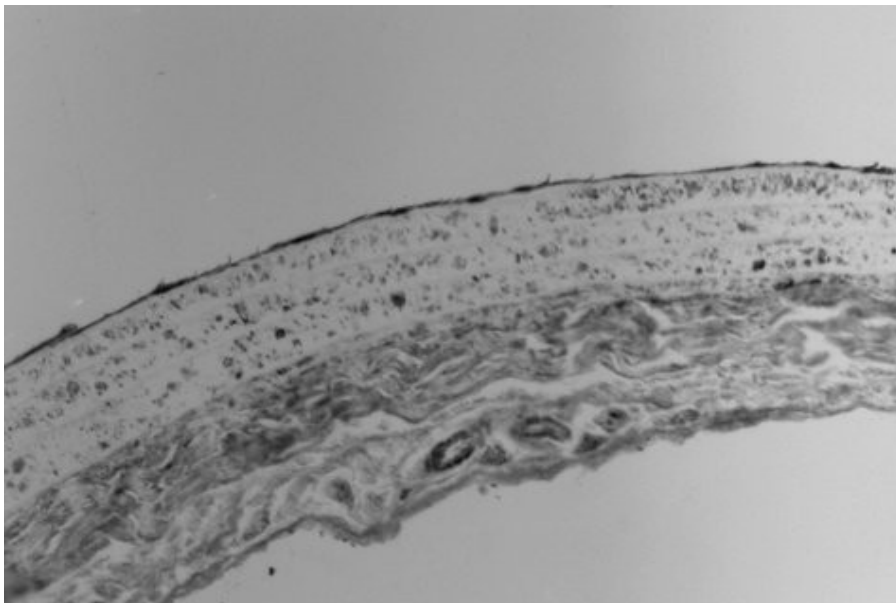


ABB 7: Intaktes Endothel an einer unvorbehandelten Arterie (AB11/9 - 1:500 - 20x0.6)

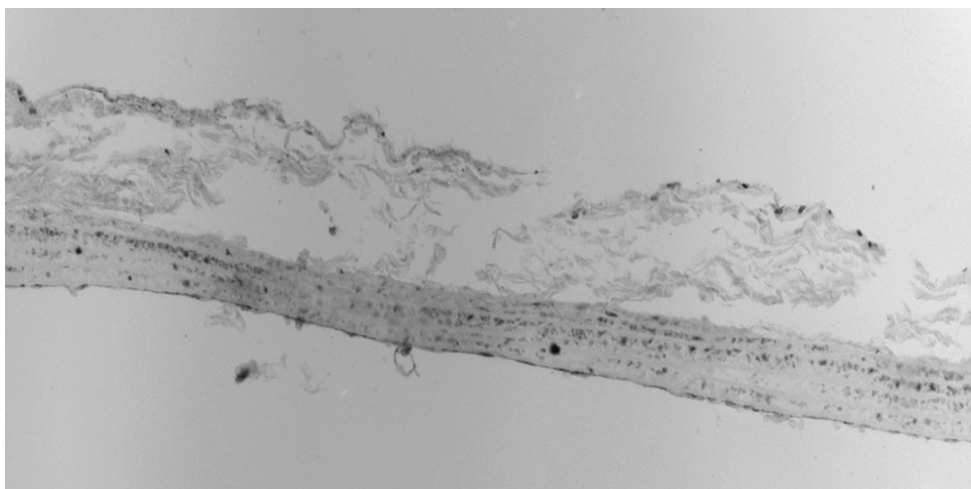


ABB 8: Teilweise erhaltenes Endothel, Abriss der Media, 8h postoperativ, (AB2/2 20x 9ms)

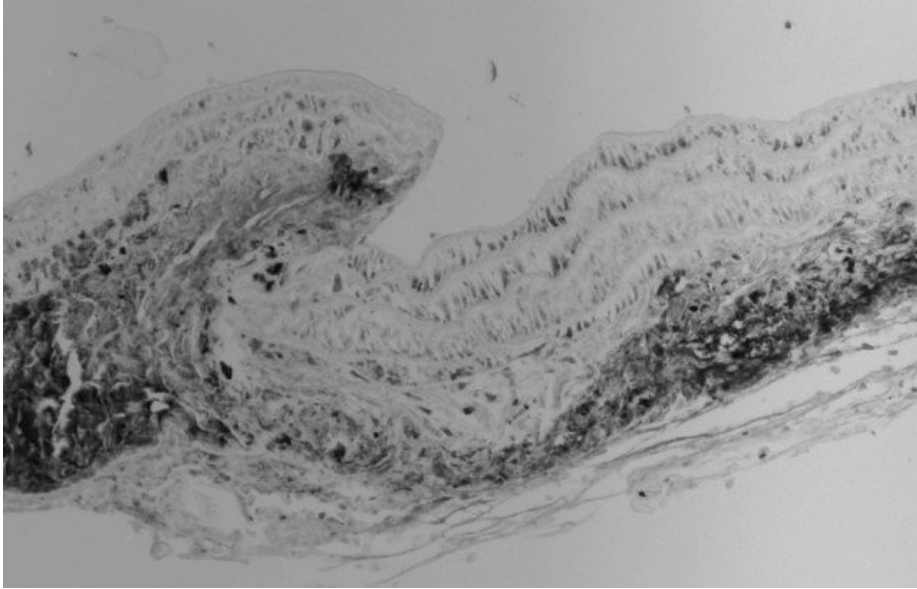


ABB 9: zerstörtes Endothel an einer proximalen Anastomose, 24h post-operativ, (AB 3/10 - 20x, 7ms)

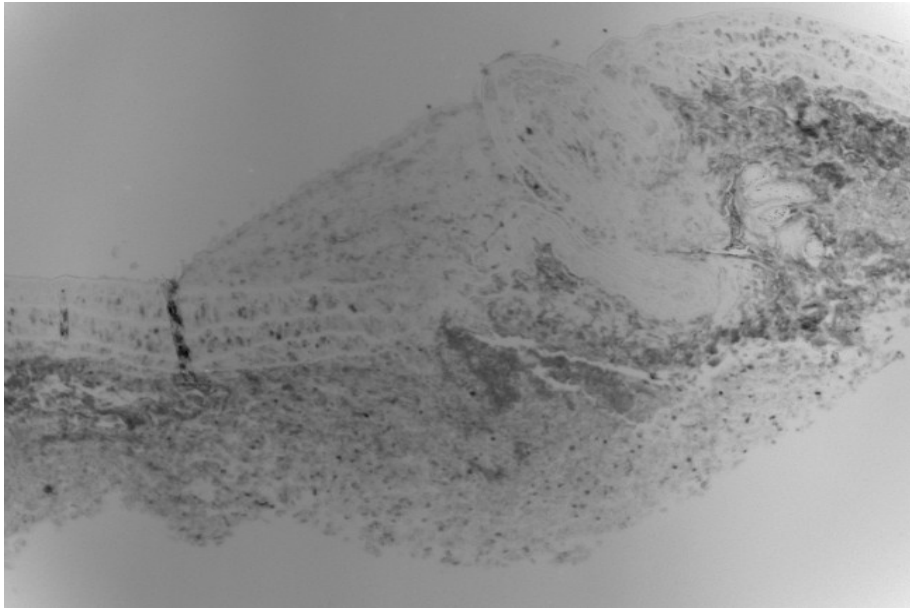


ABB 10: Verdickung der Wandstärke, proximale Anastomose, 3 Tage postoperativ, (AB 4/4 20x 9ms)

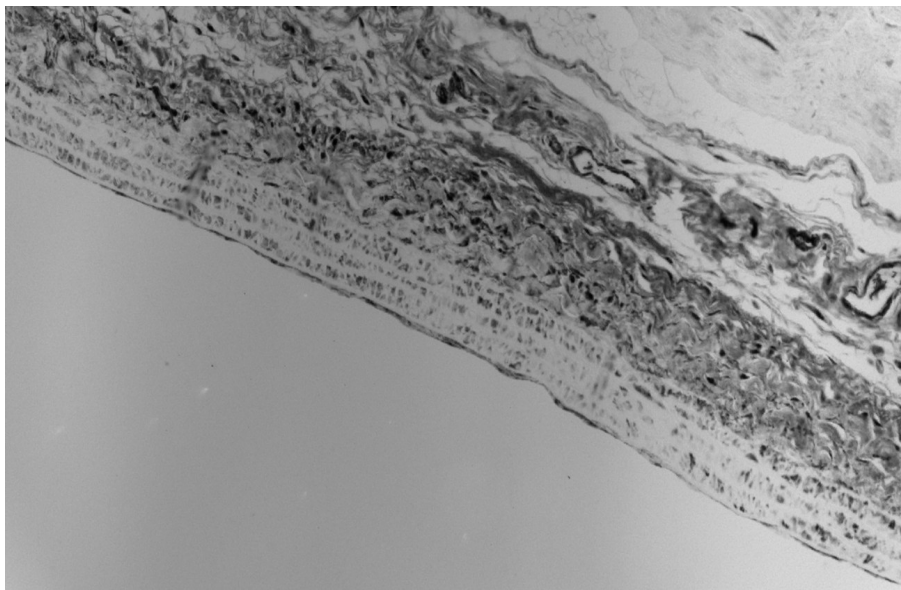


ABB 11: Teilweise vorhandene Zellen distal, 8 Tage postoperativ, (AB5/4 20x 9ms)

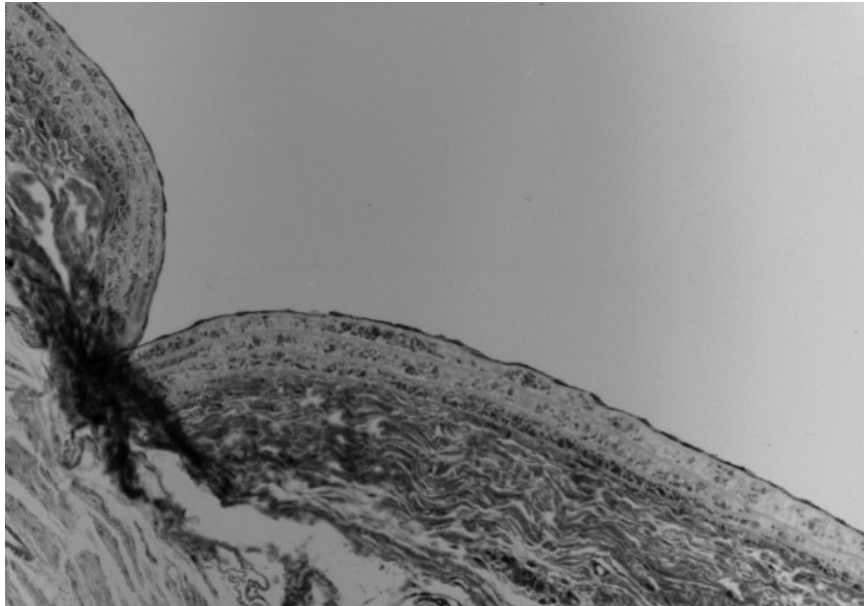


ABB 12: durchgehend wiederhergestellte Endothelschicht proximal, 28 Tage postoperativ, (AB 6/8 20x 9ms)

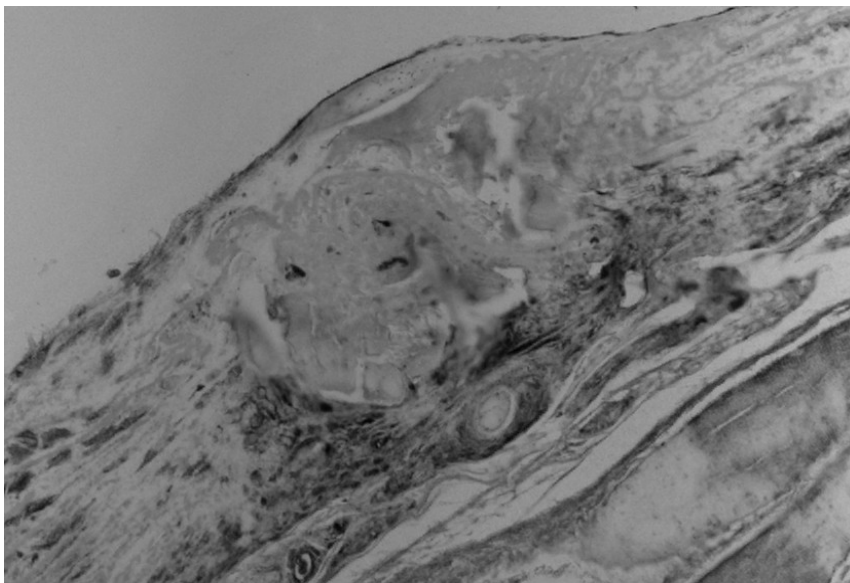


ABB 13: proximale Anastomose, das Endothel ist auch hier wieder nachweisbar, 6 Monate postoperativ, (AB 7/4 20x 9ms)

Die folgenden Grafiken zeigen den Verlauf der Endothelregeneration.

Die Ordinate ist hierbei jeweils von 0 bis 10 beschriftet und stellt die Anzahl der positiven Fundstellen bei den 10 Versuchstieren pro Versuchsgruppe dar. Die Bewertung erfolgte an der entsprechenden Messstelle in dichotomer Weise pro Tier als Ja – Nein Entscheidung.

Die Abszisse zeigt die verschiedenen Messstellen in der Reihenfolge proximal nach distal (siehe auch Abbildung 6).

In der Sofort-Gruppe ist über die gesamte Länge der Gefäße ein deutlicher Rückgang der Endothelzellenbesiedelung zu erkennen. Dies besonders an den Anastomosen und im Interponatbereich. (Abbildung 14) Diese Entwicklung führt bei der 8 Stunden-Gruppe zu einem absoluten Rückgang an den Anastomosen. In dieser Gruppe bleibt die Besiedelung proximal und distal des Operationsgebietes stärker erhalten, weniger auch im Bereich des Interponates. (Abbildung 15)

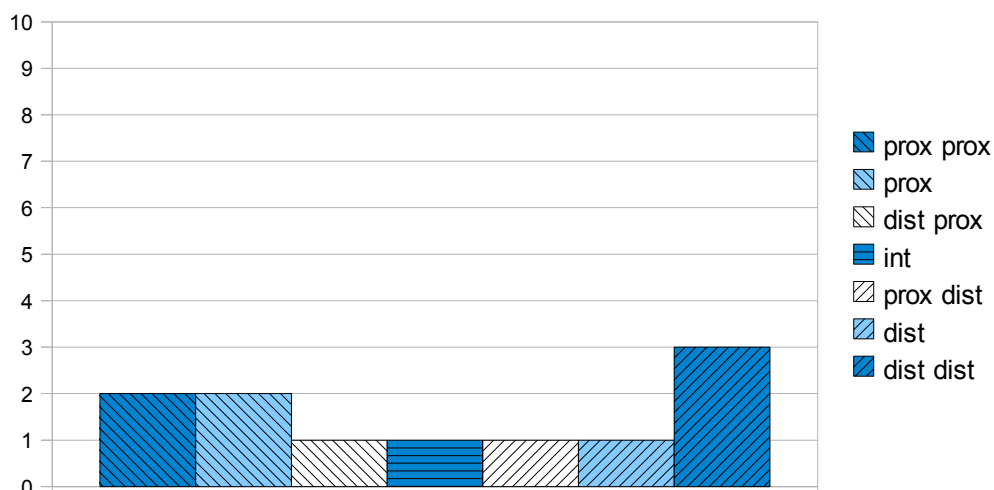


ABB 14: Grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 1 - sofort - eNOS)

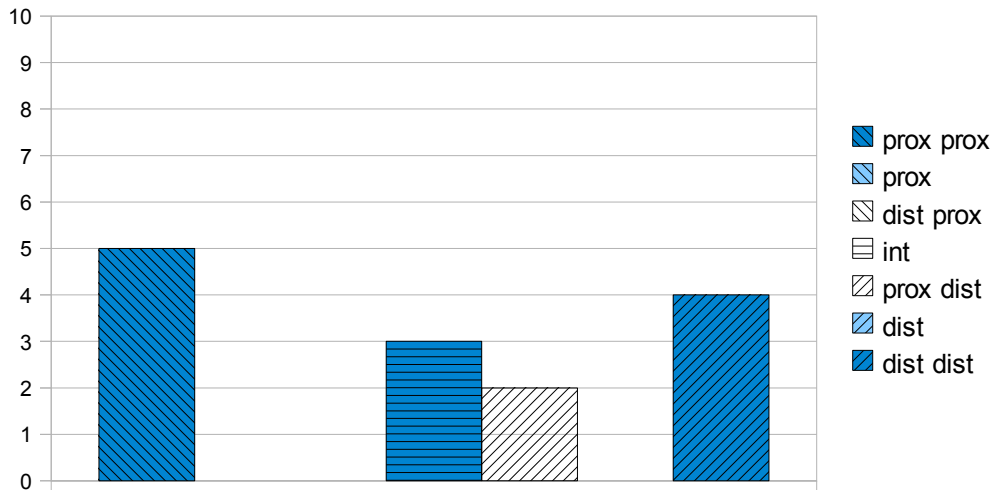


ABB 15: Grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 2 - 8h - eNOS)

Auch in den folgenden Gruppen (24 Stunden – drei Tage) bleibt das Endothel direkt an den Schnittbereichen weitgehend verschwunden, während es proximal und distal und in der Interponatsmitte stabil aber dünn besiedelt bleibt. (Abbildungen 16 + 17)

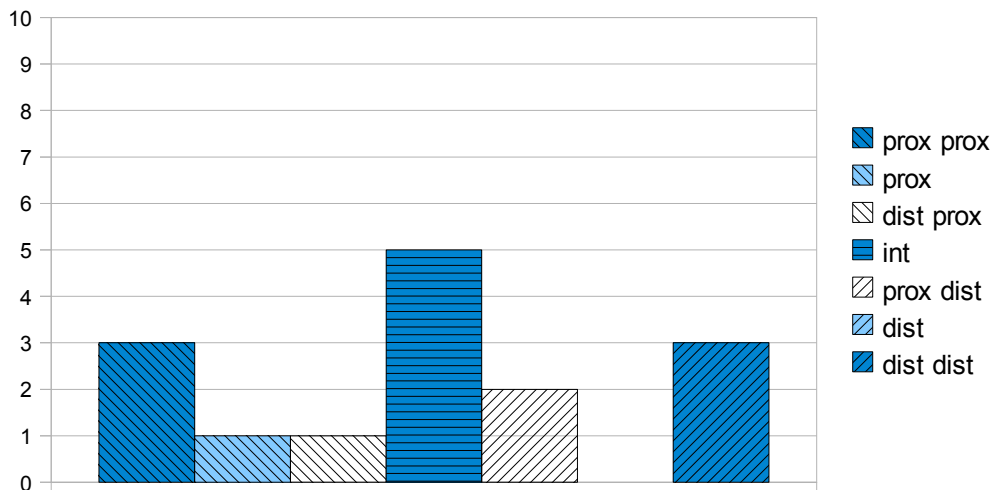


ABB 16: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 3 - 24h - eNOS)

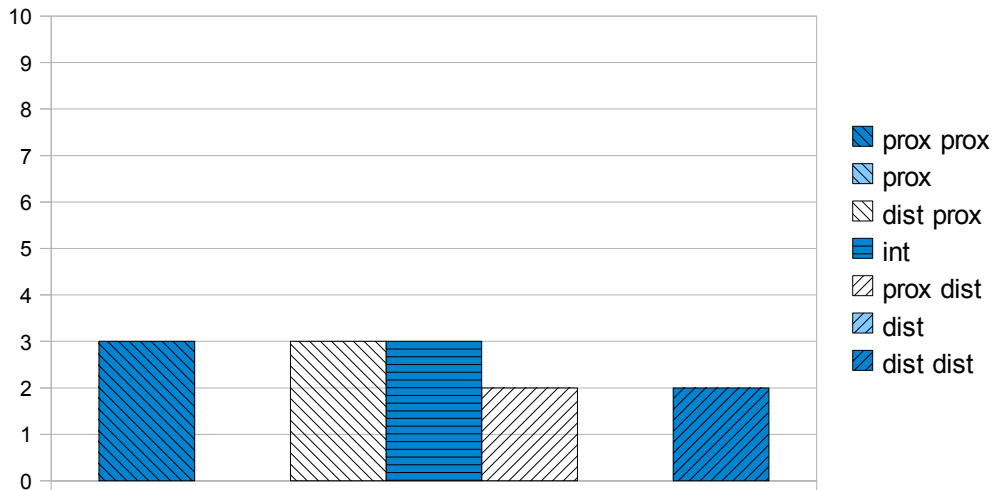


ABB 17: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 4 - 3d - eNOS)

Erstmals lassen sich in der Gruppe, welche acht Tage beobachtet wurde wieder Endothelzellen an den Anastomosen nachweisen. Über die gesamte Länge der Gefäße ist das Endothel gleichmäßig aber dünn verteilt. (Abbildung 18)

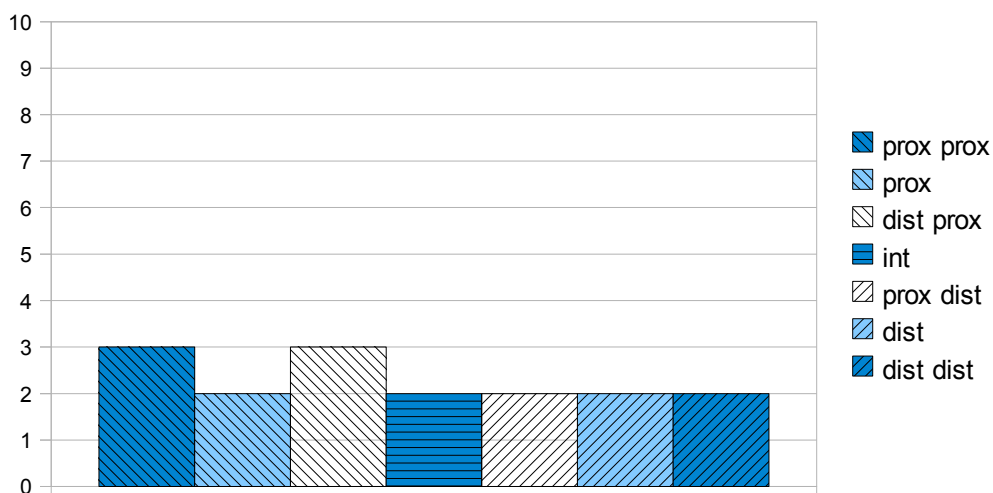


ABB 18: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 5 - 8d - eNOS)

In Gruppe sechs (28 Tage: Abbildung 19) ließ sich eine leicht stärkere Endothelhäufigkeit feststellen, als an den anderen Bereichen. Auch ist die Besiedelung insgesamt wieder höher, als in den vorherigen Gruppen.

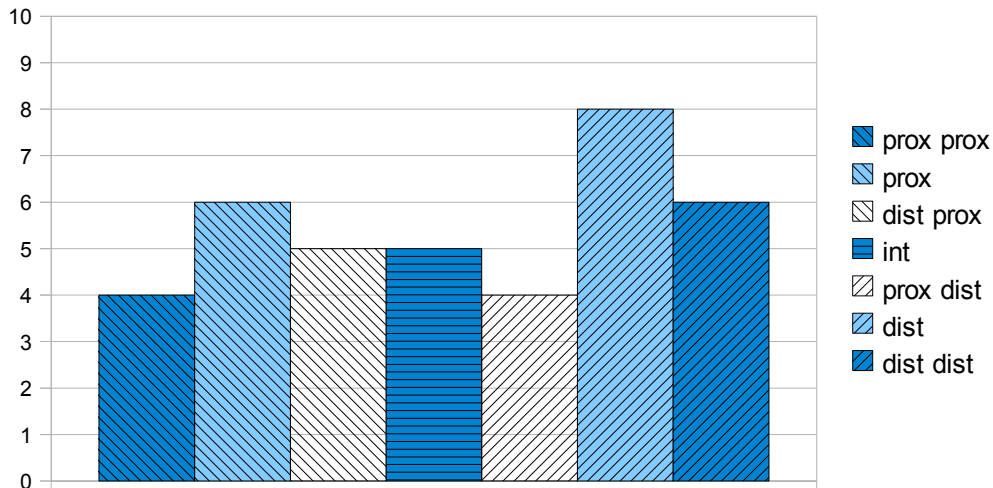


ABB 19: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 6 - 28d – eNOS)

Nach 6 Monaten ist die Endothelbesiedelung deutlich gestiegen. Sie ist relativ gleichmäßig, wobei die Messstelle distal der distalen Anastomose hier etwas aus dem Rahmen fällt und sich weniger stark frequentiert zeigte. (Abbildung 20)

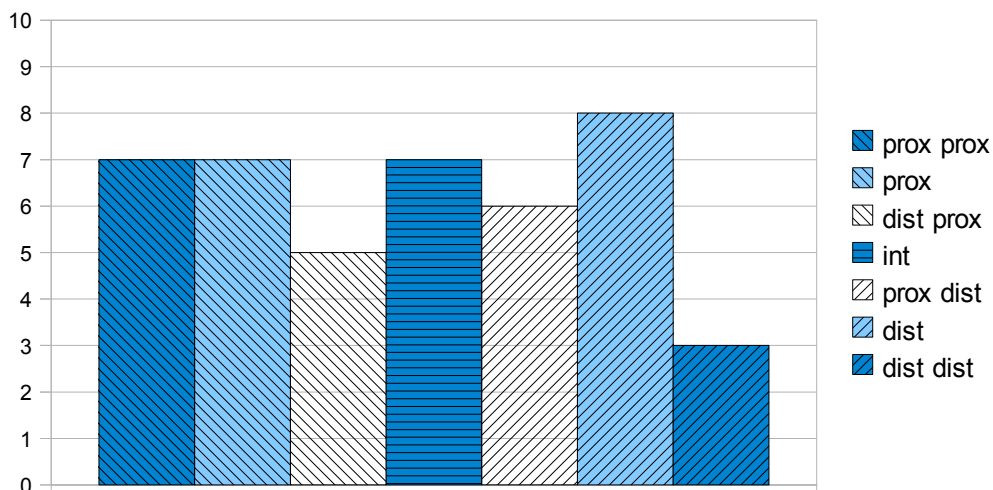


ABB 20: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 7 - 6m – eNOS)

CD34:

Das CD34 Antigen ist ein einzelkettiges membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110kD. Es ist auf unreifen humanen lymphoiden und myeloiden hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Das Antigen wird außerdem auf Kapillarendothelien gebildet. Es spielt eine Rolle bei der Identifikation vom Gefäßtumoren und bei der Charakterisierung von Leukämien.

Abbildung 21 zeigt eine intakte Endothelschicht an einem nicht operierten Tier. Die typische Wandschichtung der Arterie lässt sich gut erkennen.

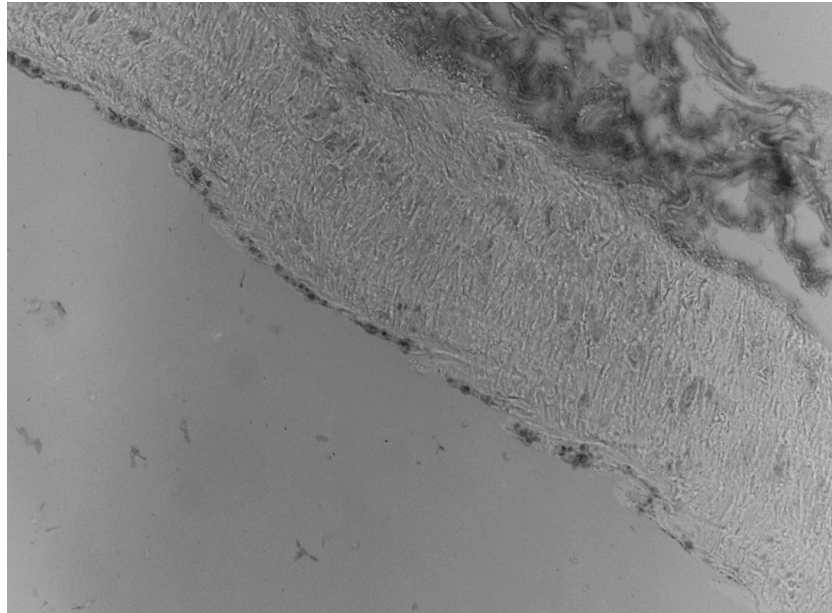
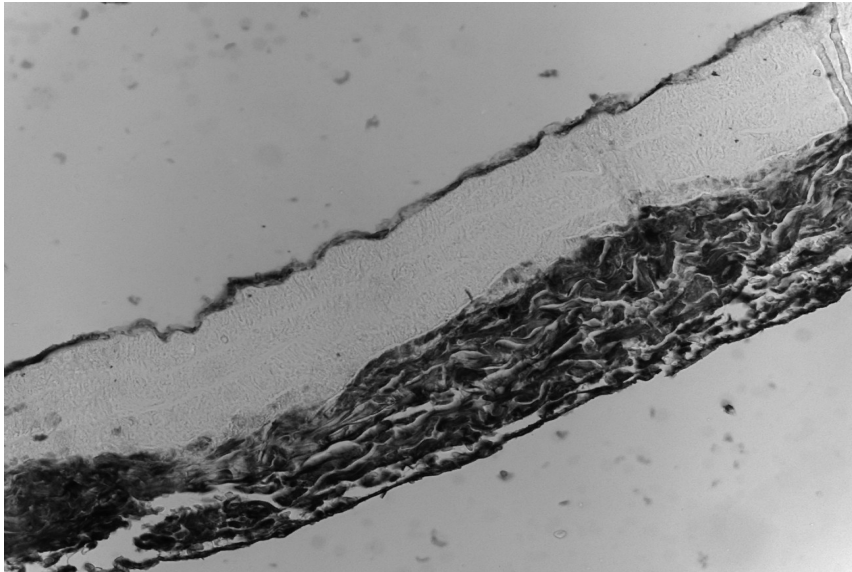
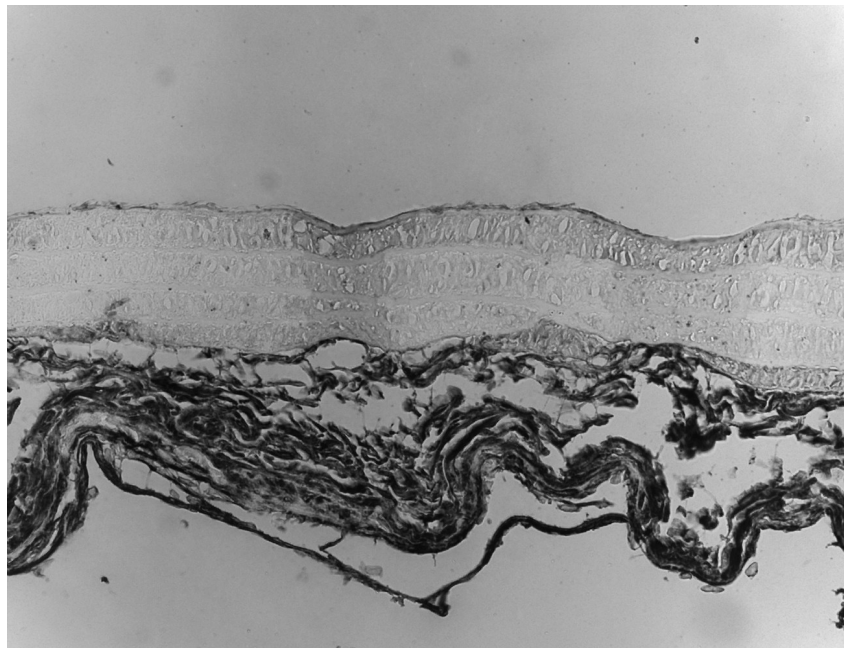


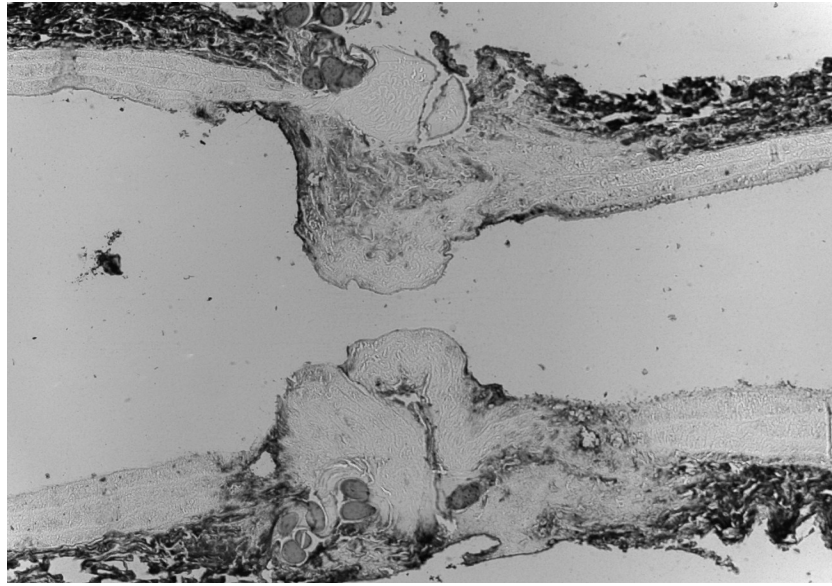
ABB 21: intakte Endothelschicht, nicht operiertes Tier, (AB11/8)



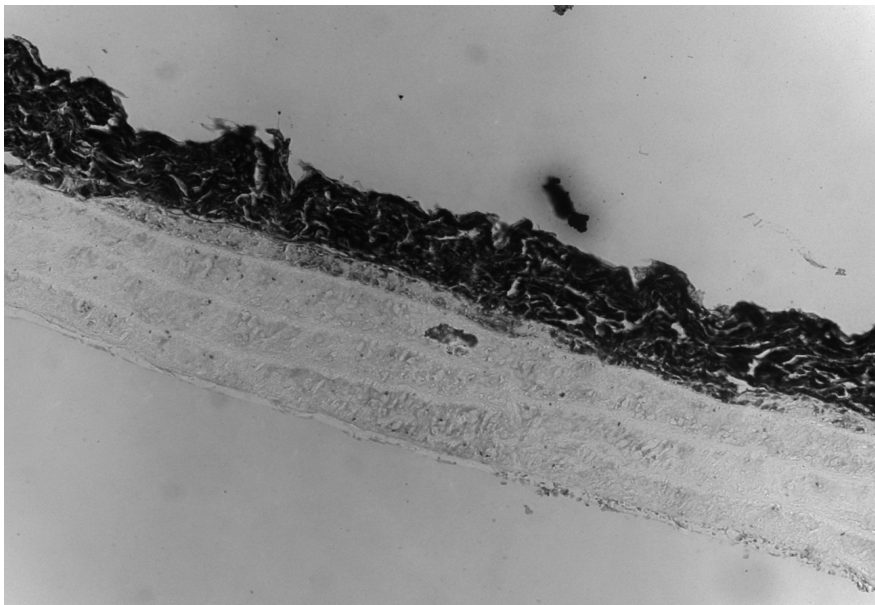
*ABB 22: A. carotis, Entnahme sofort nach OP, proximal,
AB1/2 40x17ms*



*ABB 23: Interponat, die Endothepopulation ist vollständig zu-
grunde gegangen, 8 Stunden postoperativ, AB 3/10 40x 44ms*



*ABB 24: proximale Anastomose, 3 Stunden postoperativ, AB 2/4
20x 16ms*



*ABB 25: proximaler Ausschnitt, 8 Stunden postoperativ, (AB 3/10
40x 44ms)*

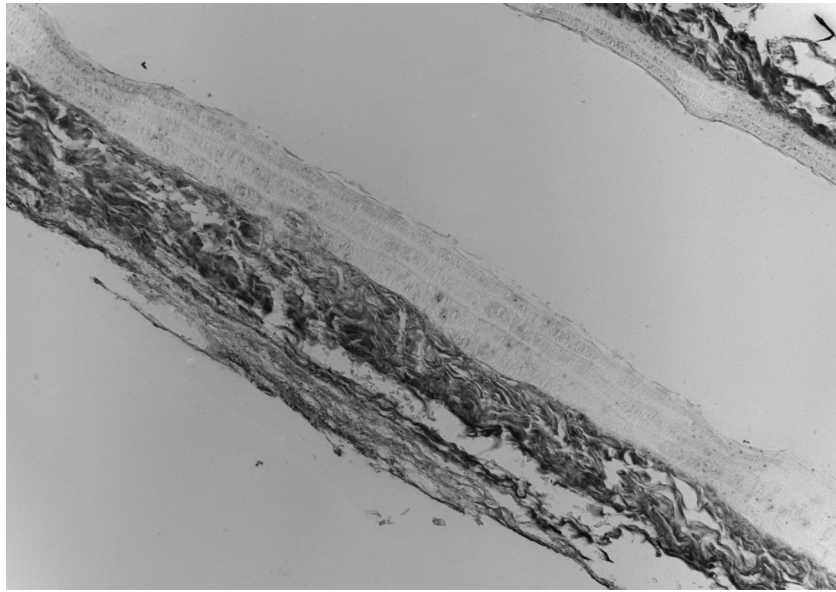
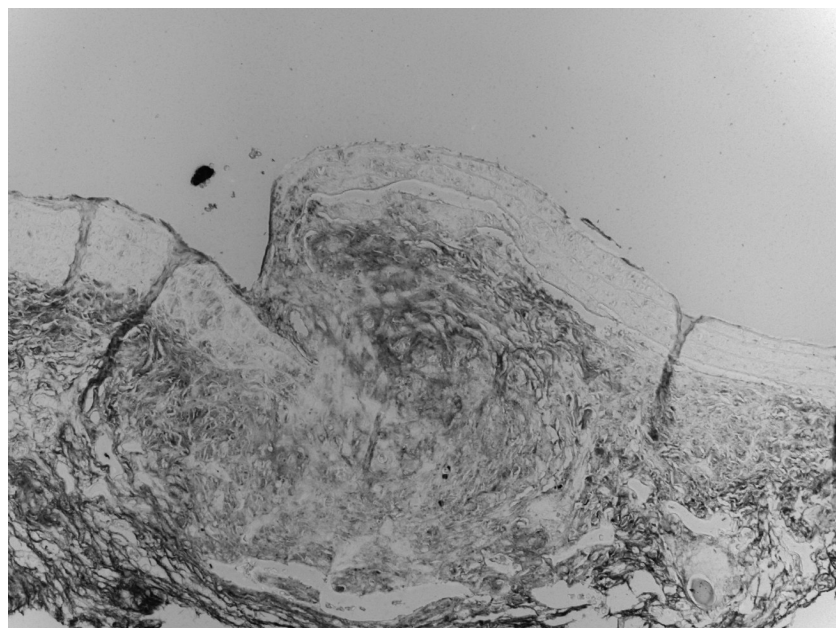


ABB 26: Interponat, 3 Tage postoperativ, AB 4/7 20x 6ms



*ABB 27: proximale Anastomose, 8 Tage postoperativ, (AB 5/3
20x 6ms)*

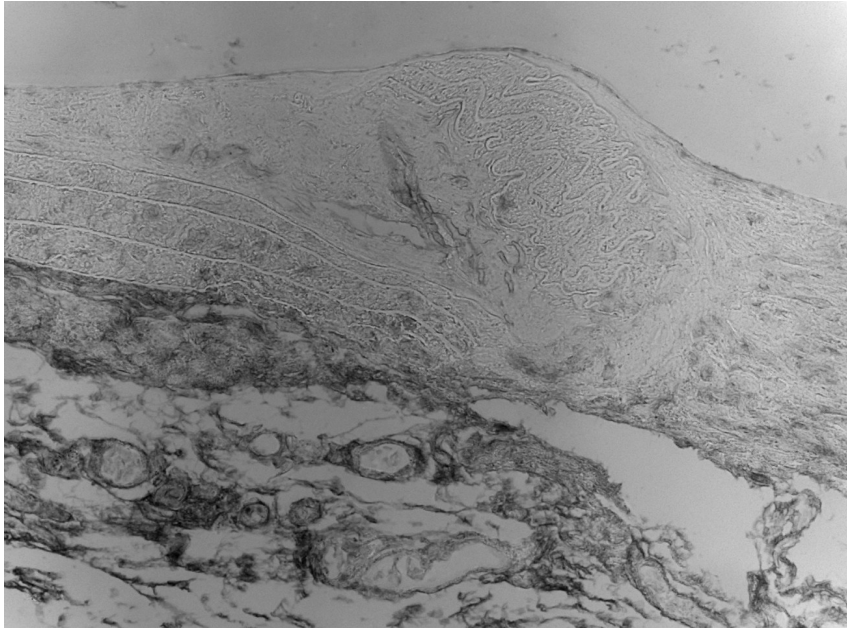


ABB 28: verlorengegangene Schicht (AB7-3 40x 23ms)

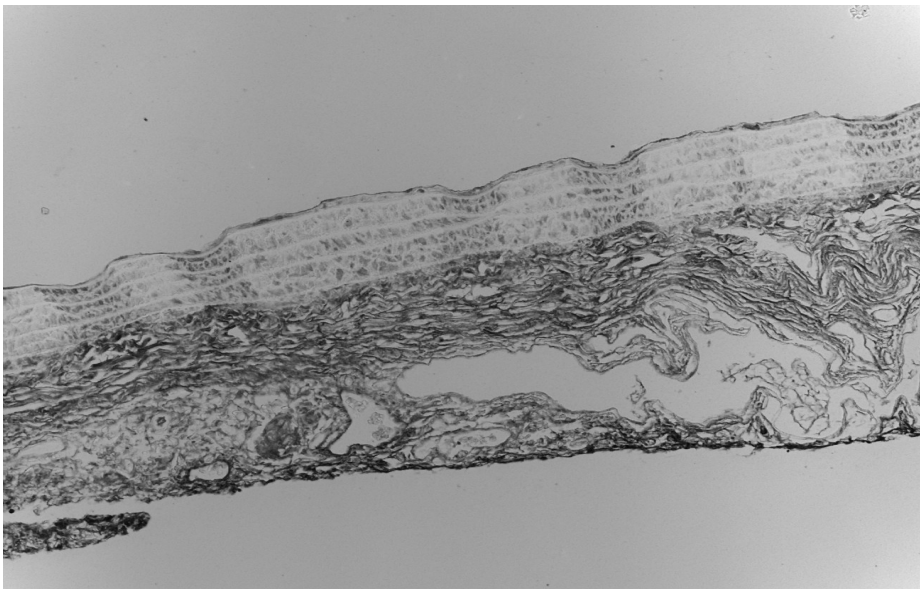


ABB 29: Interponat, 28 Tage postoperativ, (AB 6/9 20x 9ms)

Die folgenden Grafiken zeigen den Verlauf der Endothelregeneration.

Die Ordinate ist hierbei jeweils von 0 bis 10 beschriftet und stellt die Anzahl der positiven Fundstellen bei den 10 Versuchstieren pro Versuchsgruppe dar. Die Bewertung erfolgte an der entsprechenden Messstelle in dichotomer Weise pro Tier als Ja – Nein Entscheidung.

Die Abszisse zeigt die verschiedenen Messstellen in der Reihenfolge proximal nach distal (siehe auch Abbildung 6).

In der Sofort-Gruppe war proximal und distal des Operationsgebietes noch ein sehr hohes Vorkommen zu beobachten, ebenso in der Interponatsmitte. An den Anastomosen direkt ist das Endothel bereits deutlich zurückgegangen aber noch nachweisbar. (Abbildung 30)

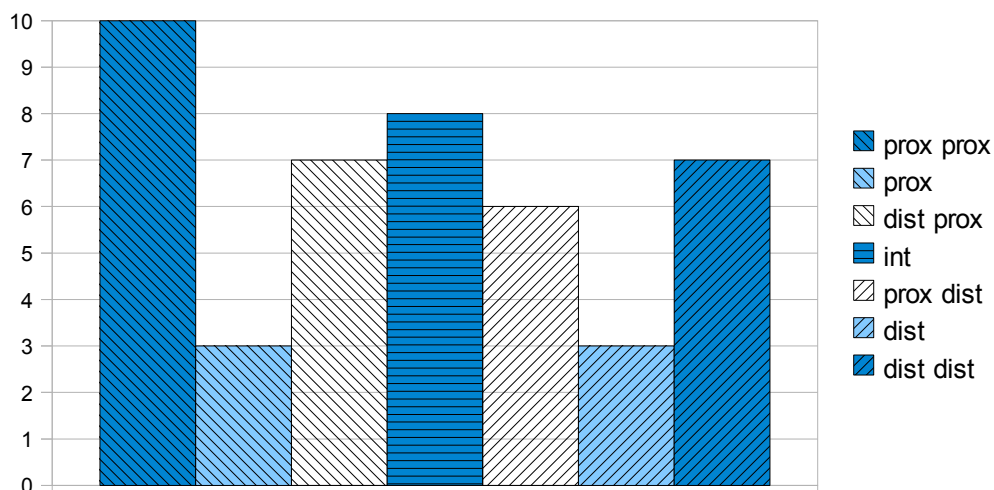


ABB 30: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 1 - sofort – CD34)

In der Gruppe 2 (8 Stunden) kam es zu einer in der Versuchsreihe einzigartigen Konstellation. Die Häufigkeit der Endothelbesiedelung nahm in der Reihenfolge proximal der Anastomose, direkt an der Anastomose, distal der Anastomose ab. (Abbildung 31) Dieses Bild zeigte sich hier an beiden Anastomosen.

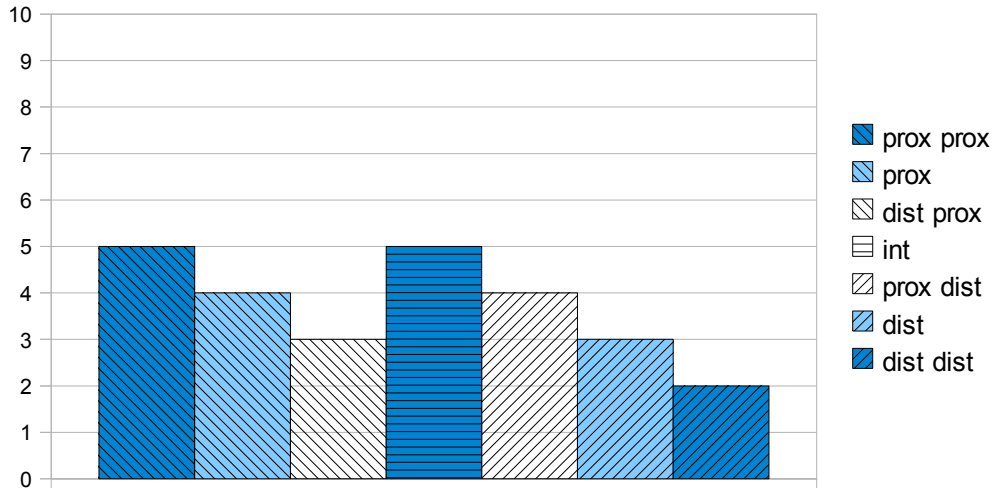


ABB 31: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 2 - 8h – CD34)

Das Endothel war in den nächsten beiden Gruppen (24 Stunden und 3 Tage) beinahe vollständig verschwunden. Nur vereinzelt waren noch Zellen nachweisbar. (Abbildungen 32 + 33)

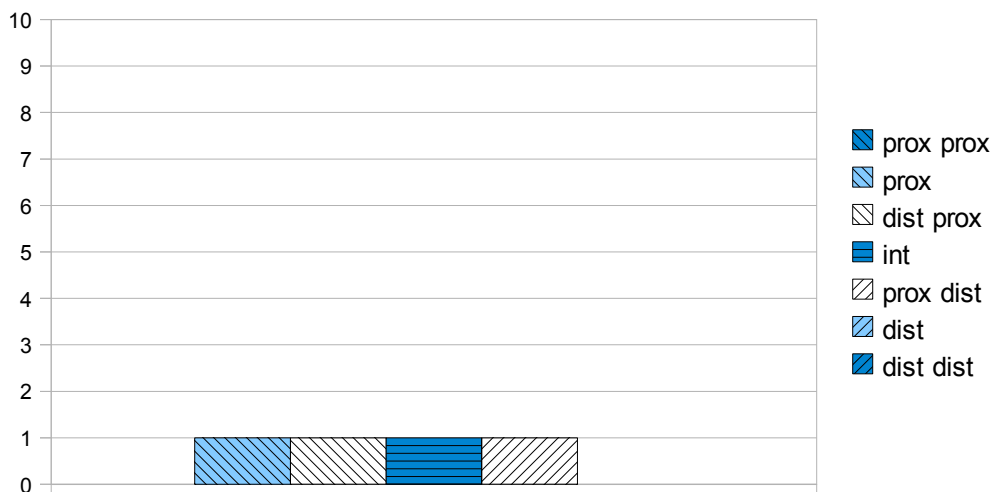


ABB 32: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 3 - 24h – CD34)



ABB 33: Grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 4 - 3d – CD34)

Die Zellpopulation erholte sich dann in der Gruppe 5 (acht Tage), wobei die Ausbreitung der Zellen von den proximalen und distalen Bereichen und der Interponatsmitte ausging. (Abbildung 34).

Diese Entwicklung führte sich in den darauf folgenden Gruppen fort wobei die Besiedelung insgesamt wieder dichter wurde, aber an den Anastomosen weniger stark, als an den übrigen Bereichen. (Abbildungen 35 und 36)

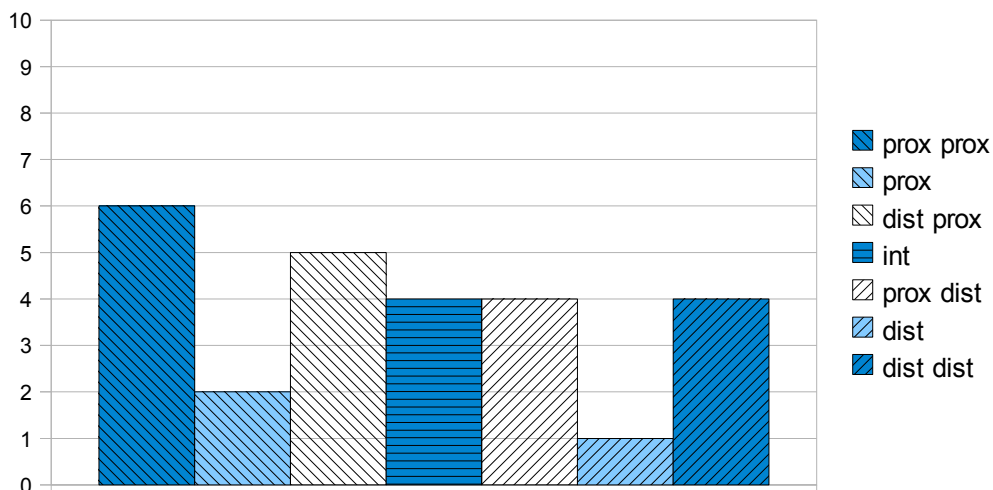


ABB 34: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 5 - 8d – CD34)

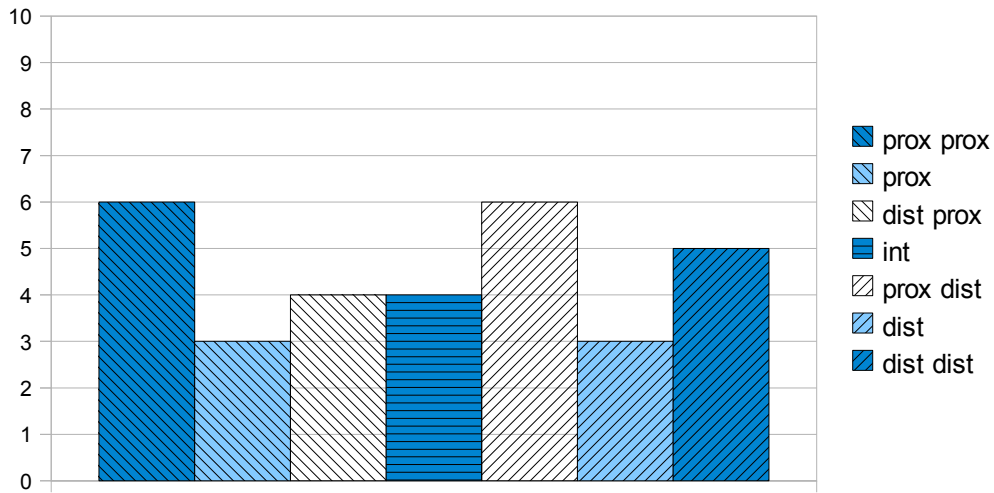


ABB 35: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 6 - 28d – CD34)

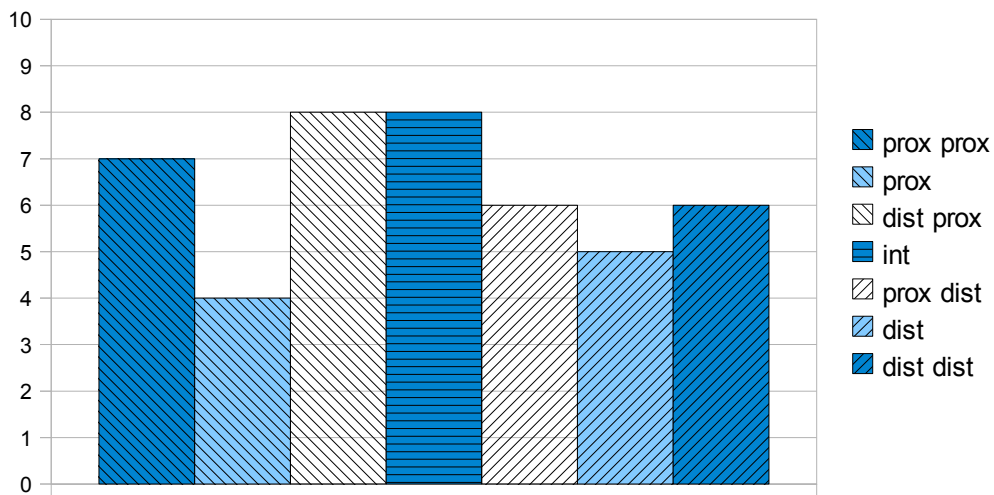


ABB 36: grafische Darstellung von endothel-positiven Stellen der verschiedenen Nachbeobachtungsgruppen (Gruppe 7 - 6m – CD34)

Zeitliche Darstellung

<i>eNOS</i>	sofort	8h	24h	3d	8d	28d	6m
prox prox	2	5	3	3	3	4	7
prox	2	0	1	0	2	6	7
dist prox	1	0	1	3	3	5	5
interp.	1	3	5	3	2	5	7
dist prox	1	2	2	2	2	4	6
dist	1	0	0	0	2	8	8
dist dist	3	4	3	2	2	6	3

Tab 4: Darstellung der Anzahl positiver Fälle des einzelnen Untersuchungsabschnittes des Gefäßes über die Zeit für eNOS

<i>CD34</i>	sofort	8h	24h	3d	8d	28d	6m
prox prox	10	5	0	1	6	6	7
prox	3	4	1	0	2	3	4
dist prox	7	3	1	0	5	4	8
interp.	8	5	1	0	4	4	8
dist prox	6	4	1	0	4	6	6
dist	3	3	0	0	1	3	5
dist dist	7	2	0	0	4	5	6

Tab 5: Darstellung der Anzahl positiver Fälle des einzelnen Untersuchungsabschnittes des Gefäßes über die Zeit für eNOS

DISKUSSION

Das gesunde Endothel verhindert die Leukozyten- und Thrombozyten-Aggregation, wirkt antiinflammatorisch, vasodilatatorisch und nimmt Einfluss auf die Gerinnung sowie auf die Fibrinolyse. Endothelzellen setzen zahlreiche Stoffe frei, die einen dilatierenden Einfluss auf die Blutgefäße ausüben. Durch eine endotheliale Dysfunktion lassen sich z.B. in signifikantem Maße häufiger kardiovaskuläre Geschehnisse beobachten. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag bezüglich der Aufklärung der Endothelregeneration nach chirurgischem Eingriff und dessen negativen Folgen auf Morphologie und Funktion einer betroffenen Arterie geleistet werden. Besonderes Augenmerk richten wir im Rahmen dieser Diskussion auf die eingangs gestellte Frage, woher die Endothelzellen einwachsen, nach welchem Muster die Wiederbesiedelung während eines Nachbeobachtungszeitraumes von 6 Monaten geschieht.

eNOS:

Das endothelabhängige Stickstoffmonoxid (NO) ist ein relaxierender Faktor für Gefäße und Hemmer der Thrombozytenaggregation. Als wichtigste Funktion des endothelialen NO wird die protektive und antiatherosklerotische Wirkung auf die Gefäßwand gesehen. Die Bedeutung des Endothels bei der Bereitstellung des eNO wurde 1980 erstmals beschrieben (Furchgott, 1980). Durch den Verlust des Endothels oder dessen Funktion und damit der endothelialen Stickoxid-Synthase kommt es zu einer gestörten Vasodilatation (Busse & Fleming, 1995; Moncada et al., 1991; Palmer et al., 1987), zu einer Thrombozytenaggregation und -adhäsion und einer uninhibierten Proliferation der Gefäßmuskelzellen (Radomski et al., 1990; Walter, 1989).

In der Sofort-Gruppe kann die eNOS im Anastomosenbereich nur zu durchschnittlich 16,7% nachgewiesen werden, im Interponatbereich nur zu 10%. Nach einer Untersuchung von Gefäßklemmschäden von Thurston geht das Endothel nach 4 Stunden nahezu vollständig verloren (Thurston et al. 1976). In der Gruppe 2 (nach 8h) bestätigt sich dies. Im engeren Anastomosenbereich ist kein Endothel nachweisbar, während es proximal und distal des Interponats und im Interponat selber noch nachweisbar ist. Nach 8 Tagen lassen sich erste Endothelzellen direkt an den Anastomosen beobachten. Nach sechs Monaten Nachbeobachtungszeit ließ sich

die eNOS im Anastomosenbereich durchschnittlich zu 75% wieder nachweisen, wobei hier kein Unterschied zwischen Anastomose, Interponat oder angrenzenden Bereichen mehr festzustellen ist. Die Besiedelung hat sich relativ gleichmäßig verteilt.

Der genaue Mechanismus der Einwachsung des Endothels lässt sich nun durch diese Arbeit nicht darstellen. Sichtbar wird aber, dass das Endothel direkt an den Anastomosen nach nur wenigen Stunden vollständig verloren geht und im Interponatbereich stärker als proximal und distal des OP-Bereiches. Die Regeneration scheint nach diesem initialen Abfall der Population zuerst stärker in den Randbereichen und im Interponat, dann erstmals in der 8 Tage – Gruppe auch an den Anastomosen direkt gleichmäßig zu erfolgen. Dies könnte die Möglichkeit der durch zirkulierende Blutzellen geförderten Regeneration bekräftigen. Auch ist das Einwachsen durch gesunde Randbereiche denkbar. Weiterhin lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ausschließen, dass sich die neuen Zellen aus undifferenzierten ortsständigen Zellen entwickeln.

CD34:

Der Rückgang des CD34 Antigens verläuft zunächst etwas verzögert. So ist zwar in der Gruppe 1 (sofort) direkt an den Anastomosen am wenigsten Endothel darstellbar, aber es verschwindet nicht vollständig. Über die gesamte Länge des Gefäßes ist noch in 62,86% ein positiver Nachweis möglich. Auch in Gruppe 2 (nach 8 h) geht das Endothel nirgends vollständig zugrunde. Sondern lässt sich mit 35% im Anastomosenbereich und 40% im Interponatbereich nachweisen.

Fast vollständig ist die Nachweisbarkeit des Antigens dann nach 24 Stunden (Gruppe 3) mit 5,71% und nach 3 Tagen (Gruppe 4) mit 1,42% zurückgegangen. Interessant ist dann die nächste Gruppe (Gruppe 5 – nach 8 Tagen), da hier die Wiederbesiedelung anfängt. Es fällt auf, dass die Zellen sich sowohl an den proximalen und distalen Randbereichen, als auch im Interponatsbereich in signifikant höherer Anzahl nachweisen lässt, als in der Anastomose direkt. Der weitere Verlauf der Regeneration in den folgenden beiden Gruppen zeigt eine weitgehend gleichmäßige Steigerung der positiven Messstellen, wobei auch hier die Anastomosen direkt weniger besiedelt sind.

Das Muster in Gruppe 5 (nach 8 Tagen) schließt keine der vier besprochenen Möglichkeiten aus, lässt aber doch eine isolierte und alleinige Einsprossung aus den ortsständigen Endothel-

zellen der gesunden Randbereiche unwahrscheinlich erscheinen, da im vorher unbesiedelten Interponat (Gruppe 4) eine höhere Population zu beobachten ist, als an den Anastomosen.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung:

Bei der Durchführung von autologen Gefäßinterponaten an der Arteria carotis comm. der Wistar-Ratte erfolgt ein Verlust des gesamten Endothels im Transplantat und an den Anastomosen. Die endotheliale Stickstoffsynthetase (eNOS) und das Endothelin sind wichtige Faktoren in der Remodellierung des Gefäßes, in der Angiogenese und in der Haemostase. Wir untersuchen die Expression und die Verteilung der endothelialen Stickstoffsynthetase (eNOS) und des Endothelins zu verschiedenen Zeitpunkten der Wundheilung als Parameter der Reendothelialisierung.

Material und Methode:

An vorliegenden Präparaten, bei denen bei 70 Wistar-Ratten, aufgeteilt in 7 Gruppen mit je 10 Tieren, ein ungefähr 4 mm langer Abschnitt der A. carotis communis rechts entnommen und nach Drehung um 180° beidseitig erneut interponiert wurde, wurde nach einem gruppendefinierten Zeitintervall zwischen sofort nach der Reperfusion bis 6 Monate postoperativ die Entnahme der A. carotis communis mit Bifurkation nach Kardioperfusion durchgeführt. Die formalinfixierten, paraffineingebetteten Blöcke wurden im Längsschnitt eröffnet. Durchgeführt wurde durch Herrn Timendorfer die immunhistochemische anti-eNOS- und die anti-Endothelin-Färbung. Jedes Gefäß wurde an sieben Punkten auf positive Endothelfärbung untersucht. Die Ergebnisse wurden tabellarisch, graphisch und statistisch ausgewertet.

Ergebnisse:

Die Auswertung erfolgte mittels Untersuchung der Häufigkeiten der positiven Färbungen im Gefäßverlauf zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten. Mit der systematischen Untersuchung wurde der Verlauf der eNOS- und Endothelin-Konzentration im Anastomosenbereich und im Interponatbereich tabellarisch und graphisch und statistisch dargestellt.

Schlußfolgerung:

Mittels eNOS und Endothelin als Parameter konnten luminal an den Vasa vasorum im Anastomosenbereich und im Bereich des Transplantates frühzeitig entstehende Endothelzellen nachgewiesen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

Acland R (1972)

Signs of patency in small vessel anastomosis.

Surgery 72: 744-748

Auerbach R, Bielich H, Obeso J, Weber J (1991)

Quantitation of endothelial cell movement.

In: RN Feinberg, GK Sherer, R Auerbach (eds): „The Development of the Vascular System.“

Issues Biomed, Vol 14, Karger, Basel, p 93-108

Baxter TJ, O'Brien BM, Henderson PN, Bennet RC (1972)

The histopathology of small vessels following microvascular repair.

Brit J Surg 59: 617-622

Busse, R., Fleming, I. (1993):

The endothelial organ. Cardiology 8: 719-727

Busse, R., Fleming, I. (1995):

Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation.

Ann. Med. 27: 331-340

Cobbett JR (1967):

Small vessel anastomosis.

Brit J Plast Surg 1967; 20: 16-20

Friedrich, RE (2000):

Experimentelle Mikrochirurgie an vorgeschädigten Arterien

Quintessenz, Berlin 2000

Furchgott, 1980 Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V.:

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine Nature 288 1980 373-6

Guity A, Young PH, Fischer VW (1990):

In search of the „perfect“ anastomosis. Microsurgery 1990; 11(1): 5-11

Haudenschild C, Studer A (1971)

Early interactions between blood cells and severely damaged rabbit aorta.

Europ J Clin Invest 2: 1-7

Hayhurst JW, O'Brien B (1975)

An experimental study of microvascular technique, patency rates, and related factors.

Brit J Plast Surg 28: 128-132

Jacobson JH, Suarez EL (1960):

Microsurgery in anastomosis of small vessels.

Surg Forum 1960;11:243-245

Junqueira LC, Carneiro J (1991):

Histologie

Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 3. Auflage: 291-294

Komatsu S, Tamai S (1968)

Successful replantation of a completely cut off thumb.

Plast Reconstr Surg 1968; 42: 374-377

Littmann H (1954):

Ein neues Operationsmikroskop.

Klein Monatsbl Augenheilkd 1954; 124: 473-476

Malt RA, McKhann CF (1964):

Replantation of severed arms.

JAMA 1964; 189: 114-120

Meyermann R, Kletter G, Koos WT (1977 a)

Morphologic changes after vascular microanastomoses as a function of the technique used.

In: Schmiedek P (ed) "Microsurgery for Stroke".

Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, p 123-127

Meyermann R, Wissmann H, Kletter G (1977 b)

Morphologic approach to fine structural changes in the intima of the common carotid artery of the rat following microsurgery. In: Schmiedek P (ed) „Mikrosurgery for Stroke“.

Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, p 128-134

Minderjahn A, Dahm HH (1979)

Scanning electron microscope observations of microvascular anastomosis in the rat carotid artery.

J Maxillo-Fac Surg 7: 225-233

Minderjahn A (1983)

Zur Endothelregeneration nach mikrochirurgischen Gefäßeingriffen.

Rasterelektronenmikroskopische, morphometrische und autoradiographische Untersuchungen.

Habilitationsschrift, Aachen

Minderjahn A (1983)

Morphometrische und autoradiographische Untersuchungen zur Endothelregeneration. In: G

Pfeifer & N Schwenzer (Hrsg): „Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie“, Band

XXVIII, Thieme, Stuttgart, S 137-139

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991):

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.

Pharmacol. Rev. 43: 109-134

O'Brien BmcC (1970):

The tricloscope-a triple operating microscope.

Plast Reconstr Surg 1970; 45: 279

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987):

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature 327: 524-526

Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. (1990):

An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 5193-5197

Riediger D, Schlote W (1981)

Pathomorphologische Veränderungen in der Gefäßwand nach mikrochirurgischer Naht im Tierexperiment.

Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 4: 233-237

Thurston JB, uncke HJ, Chater NL, Weinstein PR (1976):

A scanning electron microscopic study of microarterial damage and repair.

Plast Reconstr Surg 57: 197

Van Gelder PA, Klopper RJ (1979)

Healing of microvascular arterial anastomoses, as seen on corrosion casts by scanning electron microscopy.

Plast Reconstr Surg 64: 59-64

Walter, U. (1989):

Physiological role of cGMP and cAMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. Rev. Physiol. Biochem.

Pharmacol. 113: 41-88

DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R.E. Friedrich für die Überlassung des Themas, für die intensive wissenschaftliche Betreuung und insbesondere für die zügige Korrektur danken.

Herrn Prof. Dr. M. Davidoff danke ich dafür, dass ich die praktischen Arbeiten in dem Labor des anatomischen Instituts durchführen durfte.

Herrn Dr. Dr. A. Bartnick danke ich für die Einführung bei dem praktischen Teil dieser Arbeit.

Frau M. Köhler danke ich für die lebenswerte Einarbeitung in die Immunhistochemie.

Silke und meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Geboren am 23.03.1976 in Celle, ledig

Neusprachliches Abitur im Juni 1995

Wehrdienst von 1995 – 1996

Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg SS 1996–WS 2003/2004:

Naturwissenschaftl. Vorprüfung am 13.10.1998, Note »befriedigend«

Zahnärztliche Vorprüfung am 21.02.2002, Note »befriedigend«

Zahnärztliche Prüfung am 01.07.2004, Note »gut«

Approbation als Zahnarzt am 01.07.2004

Assistenz Zahnarzt in der Praxis Rena Schumacher 12.2004 – 03.2005

Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr. Menninger-Stöss 05.2005 – 09.2006

Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dres. Suhrbier, Bernstein, Kaminski 10.2006 – 02.2007

Angestellter Zahnarzt in Praxis Dr. Anderer 04.2007 – 06.2007

Einstieg als Partner in die Praxis Dr. Anderer 07.2007

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.