



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Nordwestdeutsche Kieferklinik)

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Schmelzle

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Universität Hamburg

Immunhistochemische und morphologische Untersuchungen
zum Heilungsverlauf an mikrochirurgischen Autointerponaten
der Arteria carotis communis der Wistar-Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

vorgelegt von

Arnd Bartnick

aus Georgsmarienhütte

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 14. Aug. 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Reichert

Referent: Priv. Doz. Dr. R.E. Friedrich

Korreferent: Prof. Dr. R. Schmechel

INHALTSVERZEICHNIS

<u>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</u>	<u>6</u>
ENTWICKLUNG DER MIKROCHIRURGIE	6
ANWENDUNGEN DER MIKROVASKULARCHIRURGIE IN DER MKG-CHIRURGIE	6
HISTOLOGIE DER ARTERIEN	6
MIKROVASKULÄRE NAHTTECHNIKEN	7
HISTOPATHOLOGIE DER ANASTOMOSE.....	8
DAS INTERPONAT ALS BEISPIEL AUTOLOGER GEFÄßTRANSPLANTATION	9
IMMUNHISTOCHEMIE-GRUNDLAGEN	10
MERKMALE UND FUNKTIONEN DER ZIELANTIGENE	10
ZIELSETZUNGEN	13
<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>14</u>
MIKROCHIRURGISCHER ARBEITSPLATZ	14
OPERATIONSMIKROSKOP.....	14
INSTRUMENTARIUM.....	14
SPEZIES- TIERMATERIAL UND TIERHALTUNG	15
VORVERSUCHE.....	15
NARKOSE	15
OPERATIONSSITUS	16
MIKROVASKULARTECHNIK.....	17
PERFUSIONSFIXIERUNG UND ORGANEXPLANTATION	17
HAUPTVERSUCHE.....	18
KONTROLLEN	18
HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE.....	18
KONVENTIONELLE BINDEGEWEBSFÄRBUNGEN	19
IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	19
AUSWERTUNG UND DOKUMENTATION	22
<u>ERGEBNISSE</u>	<u>24</u>
FUNKTIONELLE UND MORPHOLOGISCHE ERGEBNISSE.....	24
KONVENTIONELLE BINDEGEWEBSFÄRBUNGEN	26
HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	26
ELASTICA-VAN-GIESON-FÄRBUNG.....	28
IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	29
VON-WILLEBRAND-FAKTOR (VWF)	29
LAMININ	41
KOLLAGEN III.....	47
KOLLAGEN IV.....	51
ZUSAMMENFASSUNG ERGEBNISSE	56
KONTROLLEN	61
VON-WILLEBRAND-FAKTOR (VWF)	61
LAMININ	61
KOLLAGEN III.....	63

KOLLAGEN IV.....	64
<u>DISKUSSION.....</u>	66
FUNKTIONELLE UND MORPHOLOGISCHE DISKUSSION	66
VON-WILLEBRAND-FAKTOR (vWF).....	67
LAMININ	70
KOLLAGEN III	71
KOLLAGEN IV	72
<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	73
<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	74
<u>DANKSAGUNG.....</u>	83
<u>LEBENS LAUF.....</u>	84
<u>ERKLÄRUNG.....</u>	85

Verwendete Abkürzungen

CIII	Kollagen III
CIV	Kollagen IV
EvG	Elastica-van-Gieson
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP	Hyperplasie
Koll.	Kollagen
Lam.	Laminin
vWF	Von-Willebrand-Faktor

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Entwicklung der Mikrochirurgie

Mikrochirurgie bedarf der Arbeit unter einem Operationsmikroskop. Erste Versuche wurden 1921 von NYLEN in der Otolaryngologie zur Mittelohrrekonstruktion gemacht. Die Firma Carl Zeiss stellte 1953 das OpMi 1 vor, ein binoculares Operationsmikroskop. Ab den 60er Jahren wurde die Replantation von Extremitäten versucht, ab den 70er Jahren waren 2-3-köpfige Operationsmikroskope mit Fußsteuerung der Zoomeinstellung verfügbar. Von da an häuften sich die Berichte über erfolgreiche freie Lappentransplantate (AUSTIN 1983). Hierbei stellen die mikrochirurgischen arteriellen und venösen Anastomosen die entscheidenden Verbindungsstellen zwischen dem Lappen und der Empfängerregion dar. In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie wird die Technik seit Mitte der 70er Jahre angewendet (DANIEL & TAYLOR 1975, HARIJ et al. 1976 a & b, 1985).

Anwendungen der Mikrovaskularchirurgie in der MKG-Chirurgie

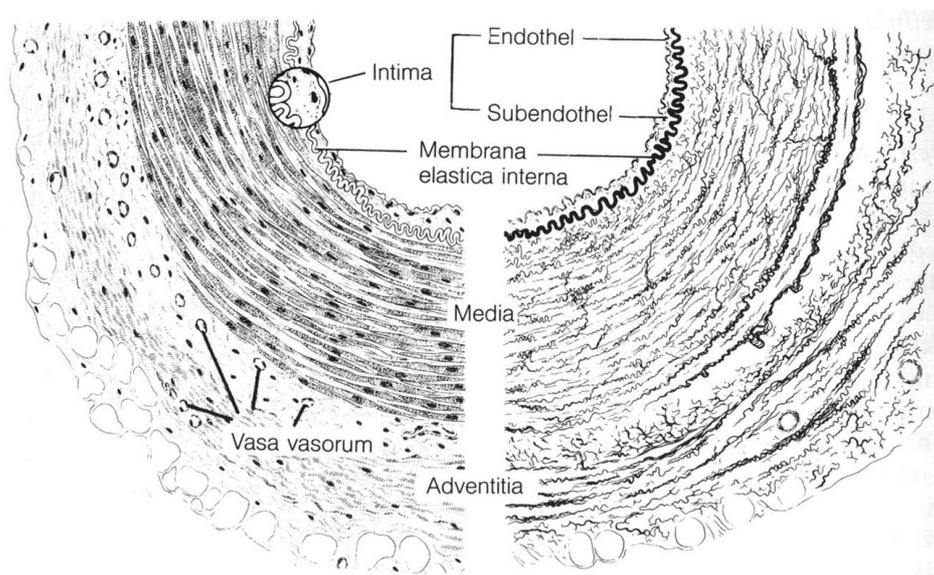
Die Mikrovaskularchirurgie wird in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie in der Regel nur zum freien Gewebetransfer angewendet. Hierbei kommen viele unterschiedlichste Lappen zur Anwendung. Die Indikation für einen freien Gewebetransfer ist gegeben bei der Rekonstruktion großer äußerer Defekte, bei der funktionellen Rekonstruktion des Pharynx und der Mundhöhle, z.B. nach Tumorsektionen, bei schlecht heilenden Defekten, z.B. nach Bestrahlung, oder bei großen infizierten Wunden. Je nach Indikation kommen dabei große, voluminöse Lappen (Rectus-abdominis-Lappen, Latissimus-dorsi-Lappen), dünne, fasziokutane Lappen (volarer Unterarm-lappen, Fußrückenlappen, Skapulalappen), freies Jejunum, ossäre Transplantate (Becken, Fibula) oder kombinierte Lappen (z.B. osseomuskulokutan) (BOOTZ & MÜLLER 1992) zur Anwendung.

Histologie der Arterien

Arterien bestehen aus drei Wandschichten, der Tunica intima (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa (Adventitia). Die Intima besteht aus einer einzelligen Endothelzellschicht, welche lumenseitig das Gefäß begrenzt und einem dünnem subendothelialen Stratum. Die Abgrenzung zur Media bildet die Membrana elastica interna.

Sie enthält als Basalmembran hauptsächlich Kollagen IV, Laminin und Heparan-Sulfat-Proteoglykane. Die Media besteht aus meist ringförmig angeordneten Muskelzellen, zwischen denen Kollagene, Elastin und Proteoglykane vorkommen. Das elastische Gerüst der Media besteht aus kräftigen Lamellen in konzentrischer Schichtung. Die Adventitia besteht aus Bindegewebe mit elastischen Fasern, Vasa vasorum und einem perivaskulären Nervenplexus (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991, BARGMANN 1951). Bei der Ratte gibt es typischerweise 4-6 Schichten einer Lamina elastica, die in der Media mit den glatten Muskelzellen alterieren (KLEINE-DÜRSCHMIDT 1989).

ABB. 1: HISTOLOGISCHER GEFÄßAUFBAU



links:
schematische
HE-Färbung
rechts:
schematische
EvG-Färbung

JUNQUEIRA
1991

Mikrovaskuläre Nahttechniken

Ziel ist immer die Durchgängigkeit des Gefäßes. Die Grundregel ist der senkrechte Einstich durch alle Gefäßwände. Der Einstich sollte 60-80µm vom Gefäßrand entfernt erfolgen. Eine spannungslose Adaptation der Gefäßwände ist angestrebt (HÖLTJE & SCHWIPPER 1983, HAYHURST & O'BRIEN 1975). In der Regel wird nicht-resorbierbares Nahtmaterial verwendet (besser zu verarbeiten, ohne Reißkraftverlust, bei etwas größerer Fremdkörperreaktion im Vergleich mit resorbierbarem Nahtmaterial) (KALETSCHEK 1982). Einzelknopfnähte sind üblich. Die Biangulation war die erste Standardtechnik. Hierbei wurden initial zwei Haltefäden im 180°-Winkel angebracht. Nachteilig war insbesondere unter Spannung der Haltefäden die Gefahr des Mitfassens der Hinterwand beim Einstich (COBBETT 1967, FOUCHER & SCHUIND 1984, FUJINO 1975). Modifizierend wurden die Haltefäden oberhalb des Äquators angebracht. Der nach oben offene 120°-Winkel bildet die

Grundlage für die Technik der exzentrischen Biangulation (COBBETT 1967). Die Naht der Rückwand erfolgt nach einer 180°-Drehung des Gefäßes nach Fertigstellung der Vorderwand. Viele weitere Techniken und Modifikationen konnten sich nicht durchsetzen (FOUCHER & SCHUIND 1984, FUJINO 1975, GONZALEZ & NATHAN 1963, HAMILTON 1979, NATHAN 1976). Nach Wiedereröffnung läßt sich die Durchgängigkeit mittels zweier distal der Anastomose angelegter Pinzetten testen. Die sofortige Wiederauffüllung des Gefäßes von proximal nach Eröffnung der vorderen Pinzette zeigt die Durchgängigkeit an (HAYHURST & O'BRIEN 1975). Wesentlich atraumatischer ist die Pulsationsbeurteilung (ACLAND 1972). Partielle Okklusionen durch Thromben fallen bei diesen Test nicht auf (KRAG & HOLCK 1981, NIEUBORGH 1979). Der ultimative Test der Gefäßdurchgängigkeit ist die makroskopische Durchgängigkeit bei der Entnahme (ACLAND 1972). Klinisch hat sich die nicht-invasive Dopplersonographie durchsetzen können.

Histopathologie der Anastomose

Die Beobachtungen betreffen direkte mikrovaskuläre End-zu-End-Anastomosen an Arterien mit Durchmessern um 1mm. Unter Voraussetzung einer guten Appositionstechnik der Gefäßstümpfe wurden während verschiedener Entnahmezeitpunkte, bis zu 18 Wochen postoperativ (BAXTER et al. 1972), folgende Veränderungen beobachtet: Bereits Stunden nach der Anastomosierung zeigt sich eine langstreckige Intimaendothel- und partielle Medianekrose. Auf dem freiliegenden subendothelialen Bindegewebe zeigen sich nach 12 Stunden Ansammlungen von Thrombozyten (MINDERJAHN 1979). Die Medianekrose wird begünstigt durch schlechte Gefäßapposition und an den Nahtdurchstichstellen (O'BRIEN 1977). Es befindet sich ein Koagulum zwischen den Gefäßstümpfen, darüber schränkt ein dünner muraler Thrombus leicht das Lumen ein. Ab der zweiten Woche schrumpft dieser zusammen und es lassen sich glatte Muskelzellen, Elastin- und Kollagenfibrillen in diesem nachweisen (O'BRIEN 1977). Erste Endothelproliferationen lassen sich nach 2 Tagen nachweisen (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), jeweils 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. Hierbei kommt es zu einer Proliferation und Wanderung von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten aus der

Media in die Intima. Nachfolgend kommt es zu einer Synthese von Matrixproteinen und anderem extrazellulärem Material. Das Ausmaß ist abhängig von der Menge der verbliebenen vitalen Media und dem Schaden der Membrana elastica interna. Die myointimale Hyperplasie tritt distal der Anastomose auf, sie wird durch proximale Strömungshindernisse, z.B. Wulstbildungen durch zu straffe Nahttechnik oder zuviel gefäßtem Gewebe, begünstigt (MEYERMANN et al. 1977, HÖLTJE & SCHWIPPER 1983, GREENWALD & BERRY 2000, TAMAKI et al. 1999). Nach 4-8 Wochen ist die Anastomose organisiert. Eine vollständige Regeneration der Media bleibt aus (ACLAND & TRACHTENBERG 1977, BAXTER et al. 1972). Falls es zu Gefäßverschlüssen nach der Reanastomosierung kommt, sind in der Frühphase Thrombosen oder mechanische Flußstörungen die Hauptursachen. Die Mehrzahl der Thrombosen findet in den ersten 72 Stunden statt (HAYHURST & O'BRIEN 1975). Thrombosen in der Spätphase entstehen meist infolge intimaler und neointimaler fibröser Proliferationen (IMPARO 1972 & 1974). Bei Gefäßverschlüssen 6 Monate bis 3 Jahre nach der Gefäßoperation liegen die Hauptursachen entweder in der Progression einer distalen myointimalen Hyperplasie oder in proximal oder distal der Anastomose auftretenden Gefäßinsuffizienzen (TAMAKI et al. 1999).

Das Interponat als Beispiel autologer Gefäßtransplantation

Der Gefäßersatz spielt in der heutigen Medizin eine sehr wichtige Rolle. Pro Jahr werden weltweit mehr als eine Million Gefäße ersetzt (GREENWALD & BERRY 2000). Hierbei sind Klappenersätze nicht mit eingerechnet worden. Die Gefäßersatz umfassen synthetische, denaturierte menschliche oder tierische und autologe Gefäße, sie umfassen sowohl arterielle, wie auch venöse Gefäße. Kurzfristige Ziel ist ein dichtes Gefäß ohne Thrombose mit einer guten Versorgung der abhängigen Gewebe. Langfristig spielen die mechanischen und hämodynamischen Eigenschaften der Gefäßprothese die Hauptrolle. Ein Material für den Gefäßersatz muß verschiedene Anforderungen erfüllen. Einige davon sind Biokompatibilität, geringe Thrombogenität, Sterilität, Flexibilität, ausreichende Festigkeit, mechanische Eigenschaften, die dem ursprünglichem Gefäß entsprechen. Bei großen Gefäßen (Durchmesser > 6mm) gibt es viele moderne Materialien, die den Anforderungen entsprechen und mit sehr guten Erfolgsraten verwendet werden (ABBOTT et al. 1993). Für kleinere Gefäße stellen autologe Blutgefäße das Material der Wahl dar, z. B. die Vena saphena oder die Arteria mammaria interna für Koronarersatz. Die Langzeitüberlebensrate der Gefäßersatz fällt mit abnehmendem Gefäßdurchmesser. Die häufigste Ursache für einen

Langzeitverlust dieser kleinen Gefäße stellt die myointimale Hyperplasie im Anastomosenbereich dar (GREENWALD & BERRY 2000). Insofern läßt sich unsere Versuchsanordnung ebenfalls in Bezug auf den autologen Gefäßersatz kleiner Gefäße auswerten.

Immunhistochemie-Grundlagen

Das Ziel der Immunhistochemie ist die gezielte Darstellung von bestimmten Gewebestrukturen mittels der Sichtbarmachung von Gewebeantigenen. Ursprünglich erfolgte die Technik direkt über Enzym-konjugierte-Antikörper. Mittels der indirekten Methode wurde es dann möglich, die Sensitivität zu steigern. Hierbei wird ein Enzym-markierter Sekundärantikörper auf den antigengebundenen Primärantikörper gegeben. In der Folge wurde eine drei-Schritt-Methode eingeführt, die aus dem Peroxidase-Antiperoxidase-System besteht. Eine weitere Sensitivitätssteigerung konnte mit der hohen Affinität von Avidin zu Biotin (ABC-Methode) erreicht werden (HSU et al. 1981). Hier zur Anwendung kommt eine verfeinerte ABC-Methode mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der mit mehreren Phosphatase-konjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren kann. Desweiteren ist zur immunhistochemischen Darstellung von Laminin und Fibronectin die Proteasenandauung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten die beste Möglichkeit (KIRKPATRICK & D'ARDENNE 1984).

Merkmale und Funktionen der Zielantigene

Die Gefäßwand der Ratte besteht aus vielen verschiedenen einzelnen Komponenten. Einige wesentliche sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Im Rahmen dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit den Kollagenen III und IV, mit Laminin und mit dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) als Zielantigene für unsere eingesetzten Antikörper.

TAB. 1: GEFÄßWANDBESTANDTEILE

Gefäßwandbestand- teile der Ratte	61-62%		38-39%
	Intima	Media	Adventitia
glatte Muskelzellen		60-63%	
Kollagen		14%	69-71%
Fibroblasten			16-20%
Elastin		20-23%	8-12%
Nerven			1,0-1,3%

KLEINE-DÜRSCHMIDT 1989

An Tabelle 1 muß beachtet werden, daß das Verhältnis von Elastin und Kollagenen abhängig ist vom Gefäßtyp. Je stärkere Druckkomponenten auf ein Gefäß einwirken, desto höher ist der Anteil an Elastin, in der Aorta bis zu 60% vom Trockengewicht (STEBBENS 1995). Von den Kollagenen sind zur Zeit über 15 Isoformen bekannt und nach Reihenfolge der Entdeckung durchnummeriert worden. In Gefäßen kommen hauptsächlich die Typen I, III, IV, V, VI und VIII vor. Alle diese Kollagene werden von glatten Muskelzellen synthetisiert (MIMATA et al. 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sind die Kollagene Typ III und IV von besonderem Interesse, sowie Laminin und der Von-Willebrand-Faktor, da diese Bestandteile immunhistochemisch dargestellt werden.

Kollagen Typ III gehört in die Gruppe der fibrillären Kollagene. Zusammen mit Kollagen Typ I sichert es die Organstruktur. Hierbei bildet es oftmals Co-Fibrillen mit Kollagen I. Kollagen I und III zusammen entsprechen 80-90% des Gesamtkollagens in Gefäßen. Bezüglich der Verteilung in der Gefäßwand ist Kollagen I stärker in der Adventitia, Kollagen III stärker in der Intima und Media vertreten. Es lagert sich im interlaminiären Raum entlang und um die elastischen Fasern an und bildet zusammen mit diesen eine „Sandwich“-Struktur (WOLINSKY & GLAGOV 1964), in der Media bestehend aus lamellären Einheiten (STEBBENS 1995). Kollagen III findet sich, außer in Gefäßwänden, in lymphatischen Organen, in Leber, Milz, Niere, Lunge, glatter Muskulatur und im Corium der Haut (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991). Es tritt bei einer Wundheilung an Schleimhäuten eher als Kollagen I auf und bestimmt die Wundkontraktion mit (CORNELISSEN et al. 1999, WITTE & BARBUL 1997).

Kollagen IV gehört zu den flächen-bildenden Kollagenen, neben dem Kollagen VIII und X. Es kommt in allen Arten von epi- und endothelialen Basalmembranen vor, es umgibt Muskel-

und Nervenzellen und kommt in ebenfalls in der glomerulären Basalmembran vor (STEBBENS 1995, JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991). Die In-vitro-Synthese von Kollagen IV konnte in glatten Muskelzellen und in Epithelzellen nachgewiesen werden (SANKEY & BARNES 1984).

Laminin ist ein nicht-kollagenes Gewebe verbindendes Glykoprotein, das ebenfalls in epithelialen und endothelialen Basalmembranen vorkommt. Es besteht aus 3 Ketten und je nach Anordnung unterscheidet man multiple Subtypen. Es handelt sich um ein strukturelles Glykoprotein, das dynamisch die Verbindung zwischen den Zellen und den Makromolekülen der extrazellulären Matrix aufrechterhält und über bestimmte Domänen Signale für zelluläres Wachstum und zelluläre Differenzierung gibt (STEBBENS 1995). Es ist interzellulär auch zwischen glatten Muskelzellen und Nervenzellen lokalisiert. Intrazytoplasmatisch ist keine Laminindarstellung bekannt (KIRKPATRICK & D'ARDENNE 1984). Bei den Subtypen sind die bekanntesten Laminin-1 und Laminin-5. Laminin-5 erfüllt in hohem Maße die Funktion als Adhaesionsfaktor. So ist ein Mangel an Laminin-5 ein typischer Befund bei bullösen Hauterkrankungen. Dieser kann angeboren sein (z.B. hereditäre mechanobullöse Erkrankungen) oder über Auto-Antikörper induziert sein (z.B. bullöses Pemphigoid oder Epidermolysis bullosa) (ALLBRITTON et al. 1997).

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein exklusives Sekretionsprodukt von Endothelzellen und Megakaryozyten. Nur dort wird er gebildet und freigesetzt. Freigesetzt ins menschliche Blutplasma stellt der Von-Willebrand-Faktor als multimeres Glykoprotein das größte Protein im Plasma dar. Er dient als Carrier für den Faktor VIII und schützt diesen vor Inaktivierung durch aktiviertes Protein C und Faktor Xa. Desweiteren vermittelt er die Plättchenadhaesion am Subendothel von beschädigten Blutgefäßen (FURLAN 1996).

Zielsetzungen

Diese Arbeit beschäftigt mit den Vorgängen der Wundheilung an mikrochirurgischen Anastomosen. Es wurde ein gängiges Tiermodell gewählt und versucht mittels systematischem Vorgehen zu Aussagen zu kommen. Viele ähnliche Versuchsreihen sind in den letzten Jahren und Jahrzehnten durchgeführt worden. Dennoch gibt es viele Aspekte, an denen weiterhin Unklarheiten existieren.

Wie sieht der Langzeitzustand nach mikrochirurgischen Anastomosen aus, gibt es auch nach 6 Monaten noch Veränderungen?

Woher kommt die Endothelregeneration? Vier Möglichkeiten existieren hierbei:

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

Wir möchten in der folgenden Arbeit, mittels immunhistochemischem Nachweises eines Sekretionsproduktes der Endothelzellen, unseren eigenen Standpunkt in dieser bisher ungeklärten Frage finden.

MATERIAL UND METHODEN

Mikrochirurgischer Arbeitsplatz

Unser verwendeter mikrochirurgischer Arbeitsplatz für Versuche an Kleintieren ist gestaltet in Anlehnung an Beschreibungen aus der gängigen Literatur (AUSTIN et al. 1983, BIEMER & DUSPIVA 1980)

Operationsmikroskop

Die mikrovaskularchirurgischen Eingriffe fanden an einem Mikroskop der Fa. Wild, Typ 384000, Heerbrugg, Schweiz, mit Fototubus statt (Abbildung 2). Das Gerät war mit Objektiven für 8-, 16- und 32-fache Vergrößerung ausgerüstet.

ABB. 2: OPERATIONSMIKROSKOP



Instrumentarium

Folgende Instrumente der Fa. S & T (Springer und Tritt, Neuhausen, Schweiz) wurden verwendet: Nadelhalter C-14 (Art.-Nr. 00088), anatomische Pinzetten JFS-3 (Art.-Nr. 00113) und JFL-3 (Art.-Nr. 00112), Mikroklemmenhalter CAF-4 (Art.-Nr. 00072), Schere SAS-15T und SDC-11, eine Tränenkanüle, sowie Mikroklemmen nach Acland der Größe 1 mit einem und zwei Armen (ABB-1, Art.-Nr. 00409 A, 2A, Art.-Nr. 00399 A).

Spezies- Tiermaterial und Tierhaltung

Für die Versuche wurde die Arteria carotis communis der Ratte mit ihren Aufzweigungen, der Arteria carotis externa und interna, ausgewählt. Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um Wistar-Ratten mit einem bevorzugten Ausgangsgewicht von 250-300 g. Die Tiere wurden in Käfigen gehalten und mit Wasser und Trockenfutter ad libitum versorgt. Die artgerechte Unterbringung und Versorgung der Tiere wurde von Mitarbeitern der Abteilung für Versuchstierhaltung (Leiter: Dr. med. vet. Dimigen) im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf übernommen. Die Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission genehmigt. Alle Operationen wurden von demselben Operateur durchgeführt.

Vorversuche

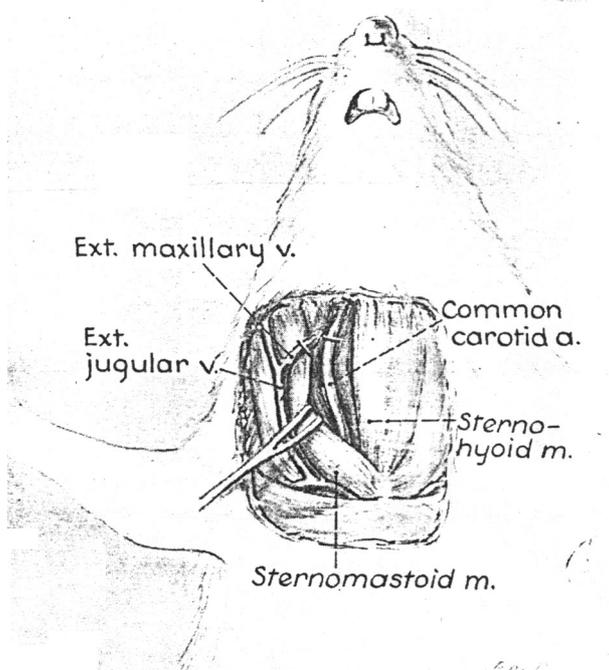
Den eigentlichen Versuchen ging eine Übungszeit an zehn Tieren derselben Art und Gewichtsklasse voraus. Es handelte sich dabei sowohl um einfache Anastomosen der Arteria carotis communis als auch um Autointerponate. Diese Gefäß Anastomosen gingen nicht in die Auswertung ein, das Vorgehen entsprach ansonsten dem unten beschriebenen Verfahren, die Tiere sind nach der Operation nicht wieder aufgewacht.

Narkose

Die Allgemeinanästhesie erfolgte über die intraperitoneale Applikation von Rompun (Bayer Leverkusen, 2% Xylazin-Lsg.) 0,1ml und Ketanest (Parke-Davis, Berlin, 50mg/ml) 0,4 ml. Nachdem die Tiere schliefen, wurde ihr Ausgangsgewicht auf einer Waage (Mettler PJ 3000, Mettler Waagen GmbH, Gießen) bestimmt.

Operationssitus

ABB. 3: OPERATIONSSITUS



STRAUCH 1967

Nach Rasur im Bereich der rechten Halsseite erfolgte ein Winkelschnitt in der Medianebene von der Submentalregion bis zur Clavicula, sodann nach rechts in Claviculahöhe fast bis zum rechten Schultergelenk. Mit Mikroinstrumenten wurde das subkutane Fettgewebe von der Muskulatur gelöst und stumpf die Glandula mandibularis abgehoben und zur Seite geschlagen. Es erfolgte die Freipräparation des M. sternocleidomastoideus. Mit Hilfe von vier monofilen Haltefäden (Deklene 4-0, Deknatel, Hamburg) wurde die Glandula mandibularis nach rechts oben gezogen, der M. sternocleidomastoideus nach links unten, die prätracheale Muskulatur nach links unten und der Haut-Fett-Bereich median des Schnittes nach links oben. Der nun dem Gefäß-Nerven-Bündel aufliegende M. omohyoideus wird in der Mitte durchtrennt und die A. carotis communis zusammen mit der Bifurkation und den proximalen Anteilen der A. carotis externa und interna über eine stumpfe Präparation freigelegt (Abbildung 3). Dieses gilt als routinemäßig eingesetztes und wenig traumatisierendes Verfahren (DÜRSELEN 1988).

Mikrovaskulartechnik

Die Arteria carotis communis wurde oberhalb des Schlüsselbeins und kurz unterhalb der Bifurkation durch die Klemmen einer maximal weit gespreizten zweiarmigen Mikroklemme nach ACLAND (Nr. 1) unterbunden. Ein 3-4 mm langes Gefäßsegment innerhalb der Klemmenarme wurde mit einer Mikroschere herausgeschnitten und die Gefäßstümpfe und das Interponat wurden mit heparinhaltiger Ringer-Lösung gespült. Das Interponat wurde um 180° gedreht und mit Einzelknopfnähten aus monofilem Ethilon (11/0, GS-13, ETHICON, D-22851 Norderstedt) in der Technik der exzentrischen Biangulation eingenäht. Das Einstechen in die Gefäßwände erfolgte bei 32-facher, die Knotungen bei 16-facher Vergrößerung. Das Operationsgebiet wurde unterdessen stets feucht gehalten. Nach fertiger Anastomosierung wurden die Klemmenarme gelöst und die Klemme entfernt. Die Reperfusion wurde visuell makroskopisch überprüft. Nach kurzer Nachbeobachtungszeit, ungefähr 15 min, wurden nach abschließender sorgfältiger Spülung des OP-Gebietes die Haltefäden entfernt und die Organe reponiert (Gl. mandibularis, M. sternocleidomastoideus). Ein dichter Verschluß der Cutis/Subcutis erfolgte durch Einzelknopfnähte.

Perfusionsfixierung und Organexplantation

Alle Gewebe wurden nach Perfusionsfixierung entnommen. Nach intraperitonealer Injektion von Phenobarbital (Nembutal®) wurden nach verschiedenen postoperativen Intervallen die Tiere erneut gewogen. Sodann, nach scharfer Eröffnung von Abdomen und Thorax, wurde das Perikard eröffnet und die linke Herzkammer mit einer orangen Braunüle (Vasofix, 14 G, Braun, D-34209 Melsungen) punktiert. Nach Darstellung wurden die Venae jugularia externae beidseitig eröffnet. Zuerst wurde 90 s mit Ringer-Lösung gespült, anschließend wurden die Tiere mit 4%iger gepufferter Formalinlösung für 10 min durchflutet. Alle Perfusionsfixierungen erfolgten bei 80 mmHg, entsprechend 108 cm Wassersäule. Aus den perfusionsfixierten Tieren wurde die rechte Arteria carotis communis bis proximal der Bifurkation erneut dargestellt und mit der Bifurkation entnommen. Anhand der Morphologie und der Durchspülbarkeit der Präparate erfolgte die Beurteilung der Durchgängigkeit. Es erfolgte die Einlage in 4%ige gepufferte Formalinlösung für ungefähr 24 h zwecks Durchfixation des Gewebes, die endgültige Einbettung erfolgte dann in Paraffinblöcke.

Hauptversuche

Die Explantationen wurden nach einem festen Zeitschema durchgeführt. Jeweils 10 Tiere gehörten einer Gruppe an, Explantationen wurden sofort nach der Operation, 8 h postoperativ, 24 h postoperativ, nach 3, 8, 28 Tagen und nach 6 Monaten durchgeführt. Die Operationen, die Nachbeobachtungszeiten und die Perfusionsfixierungen erfolgten zwischen dem 12.03.1999 und dem 06.01.2000.

TAB. 2: 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

Kontrollen

Bei 10 Tieren wurde zur Kontrolle die unveränderte Arteria carotis communis mit der Bifurkation der Gegenseite entnommen. Desweiteren wurden bei fünf Tieren die Nieren, die Zunge, Anteile der Leber und der Lunge, eine Speicheldrüse und die Milz entnommen. Nach Durchfixation in 4%iger Formalinlösung für 24 h erfolgte ebenfalls die Einbettung in Paraffinblöcke. Interne Kontrollen waren durch Vorhandensein von unverändertem Gewebe proximal und distal der Interponate in jedem Präparat gegeben.

Histologie und Immunhistochemie

Von allen paraffineingebetteten Präparaten wurden ungefähr 3µm dünne Schnitte angefertigt, wobei bei den Gefäßpräparaten infolge des geringen Umfanges jeweils drei Präparate auf einem APES-beschichtetem Objektträger (Superfrost plus, Art.-Nr. 041300, Menzel-Gläser)

aufgebracht wurden. Desgleichen wurden in der Regel mehrere Schnitte eines Kontrollorgans auf einem Objektträger aufgezogen. Die Blöcke wurden nicht komplett aufgeschnitten, sondern es wurden nach Anschnitt der Blöcke bis ins luminale Gefäßniveau pro Block 30 Schnitte (entspricht 10 Objektträgern) abgehobelt.

Konventionelle Bindegewebsfärbungen

Zur Beurteilung der normalen Morphologie sowohl der unveränderten, als auch der operierten Arteria carotis communis wurde exemplarisch von jedem Nachbeobachtungsintervall ein Präparat in Hämatoxylin-Eosin und ein Präparat in der Elastica-Färbung nach van GIESON angefertigt.

Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie ermöglicht die Identifizierung von zellulären und extrazellulären Antigenen. Alle verwendeten Präparate waren formalinfixiert und paraffineingebettet. In Vorversuchen an unveränderten Gefäßen 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 kam als Detektionssystem das LSAB 2-Kit von DAKO (K610, DAKO-Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA) in Verbindung mit DAKO New Fuchsin Substrate System (K698, DAKO-Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA) zur Anwendung. Die Färbungen liefen standardisiert nach einem Protokoll ab (Tabelle 3).

TAB. 3: PROTOKOLL FÜR LSAB2-KIT VON DAKO

ENTPARAFFINIERUNG UND HYDROPHILISIERUNG

Schnitte in Färbeschiffchen für 20 min bei 60° in Wärmeschrank

XYLOL

2x 10 min

ABSTEIGENDE ALKOHOLREIHE

2x 96%, 2x 80%, 1x 50%, 2x Leitungswasser, 1x bidest

PRONASE-VORBEHANDLUNG

Pronase E aus Kühlschrank: 0,03 g (Analysenwaage) auf 6 ml PBS (0,5% Pronase E in PBS)

Schnitte mit Lösung überschichten, in 37° Wärmeschrank für 7 min inkubieren, umpacken in Küvette und 2x in abs. Alkohol spülen

Kurze Lufttrocknung, PBS zum Anfeuchten

Spülung PBS 3x3 min

PRIMÄRANTIKÖRPER

Überstand entfernen und in feuchte Kammer überführen

Primärantikörper mit 2% BSA in PBS (im Gefrierfach) nach Wunsch verdünnen und Schnitte damit überschichten.

Inkubation bei RT für 30 min

Spülung PBS 3x3 min

INKUBATION MIT SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Schnitte mit LINK-Lösung bedecken

Für 30 min inkubieren bei RT in feuchter Kammer

Spülung PBS 3x3 min

STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASE

Schnitte mit Streptavidin-Lösung bedecken

Für 30 min inkubieren bei RT in feuchter Kammer

Spülung PBS 3x3 min

SUBSTRATE-CHROMOGEN SOLUTION

Vorbereitung:

Substrat:

2 Tropfen Tris-Puffer-Konzentrat in ein Röhrchen, mit Bidest auf 2ml auffüllen, 1 Tropfen Aktivierungsagens hinzufügen und mischen

Chromogen:

jeweils 1 Tropfen New Fuchsin Chromogen und Aktivierungsagens zusammenfügen
in einem weiteren Röhrchen und mischen

5 min stehenlassen

Substrat-Chromogen-Lösung (stabil für max. 60 min, besser sofort verarbeiten):

Substrat ins Röhrchen des Chromogens überführen und mischen

Schnitte mit Substrat-Chromogen-Lösung für 5 min inkubieren

Schnitte in PBS sammeln

GEGENFÄRBUNG

2 x Leitungswasser spülen, 1x bidest spülen, Häkalaun für 1-2 s, für 5 min fließend
wässern

AUFSTIEGENDE ALKOHOLREIHE

Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und einsetzen in

XYLOL

2x 5 min

EINDECKELN

In Eukitt

Weil drei Schnitte pro Objektträger aufgebracht worden waren, wurden zur besseren Ausnutzung der Präparate teilweise verschiedene Antikörper auf einem Objektträger aufgebracht. Insgesamt kamen vier verschiedene Antikörper zur Anwendung (Tabelle 4). Von jedem operierten Gefäß wurden Färbungen mit allen Antikörpern durchgeführt.

TAB. 4: HERKUNFT UND ART DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER

Antikörper	Produkt-Nr.	Zielantigen	Verdünnung	Quelle
Anti-Laminin	L 9393	Laminin	1:100	Sigma
Anti-Von-Willebrand-Faktor	A 0082	Von-Willebrand-Faktor	1:2000	DAKO
Anti-Kollagen III	600-401-105-0.5	Kollagen III	1:200	Rockland
Anti-Kollagen-IV		Kollagen IV	1:1000	AG-Lübeck

Bei dem verwendeten Kollagen-IV-Antikörper handelt es sich um ein Antiserum gegen Maus Kollagen IV, das entsprechend veröffentlichten Methoden hergestellt (YANG et al. 1991) wurde und uns freundlicherweise von Prof. P.K. Müller, Institut für Medizinische Molekularbiologie, Medizinische Universität zu Lübeck, überlassen wurde.

Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung erfolgte mittels eines Mikroskops (Typ BH-2, Fa. Olympus, Japan), das über einen Fototubus die Möglichkeit zur Anfertigung von Diapositiven mittels einer Olympus-Spiegelreflexkamera ermöglichte (Abbildung 4). Verwendet wurden jeweils Tageslichtdiafilme (EPR 64, Fa. Kodak) mit einem Blaufilter.

ABB. 4: MIKROSKOP ZUR AUSWERTUNG



Im Rahmen der Auswertung wurde jeder Anastomosenanschnitt im längsgeschnittenen Präparat beurteilt. Die Längsschnittebene eines Präparates bietet somit vier zu beurteilende

Anastomosen. Insgesamt ergeben sich somit bei 70 Gefäßen 280 zu beurteilende Anastomosen. Pro Beobachtungsgruppe sind 40 Anastomosenanschnitte zu beurteilen. Desweiteren wurde das Interponat, der Bereich zwischen zwei Anastomosen, sowie der Bifurkationsbereich, als nicht manipulierter Bereich geeignet für eine interne Kontrolle, beurteilt. Bei der Auswertung der Von-Willebrand-Faktor-positiven Endothelfärbung haben wir den Gefäßverlauf und den Zeitpunkt der Gefäßentnahme berücksichtigt. Ein entnommenes Gefäß wurde an neun verschiedenen Stellen auf jeder Gefäßseite untersucht. Hierbei wurden jeweils die Anastomosen im Zentrum, sowie in den proximalen und distalen Randbereichen, sowie das Interponat im Zentrum und in den proximalen und mesialen Randbereichen beurteilt (siehe Diagramm 3). Insgesamt wurde somit das Endothel an 18 verschiedenen Punkten pro Gefäß auf das Vorhandensein von Von-Willebrand-Faktor-positivem Endothel untersucht. Die Beurteilung der Durchgängigkeit war bereits bei der Organentnahme geschehen. Mikroskopisch wurde von jedem Gefäß mindestens ein Anschnitt in allen Färbungen beurteilt. Bei Vorhandensein von mehreren 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 Andauungen, im Ganzen oder zum Teil nicht beurteilen. Beurteilt wurde an den Anastomosen die morphologische Gefäßadaptation und als Ja- oder Neinentscheidung die Färbereaktion an den einzelnen Gefäßschichten (Endothel, Subendothel, Media, Adventitia). Die gleiche Beurteilung der Gefäßschichten erfolgte für die Färbereaktionen am Interponat und an der internen Kontrolle.

ERGEBNISSE

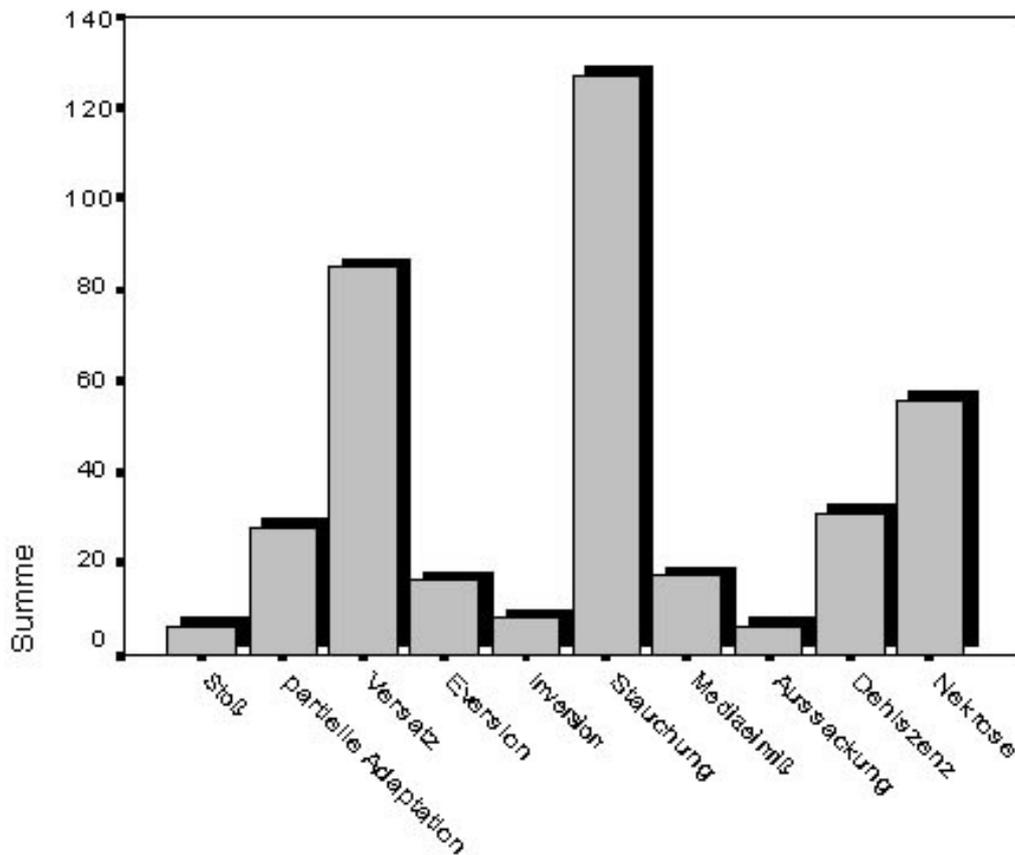
Funktionelle und morphologische Ergebnisse

In der Durchgängigkeitsprüfung bei der Gefäßentnahme war nur ein Gefäß bei der Entnahme 28 Tage postoperativ thrombotisch verschlossen (Präparat AB 6/1). Alle anderen entnommenen Gefäße waren durchgängig. Unabhängig von der zugehörigen Gruppe wurden alle Anastomosen mikroskopisch nach verschiedenen Appositionsformen eingeteilt. Insgesamt waren 280 Anastomosenanschnitte zu beurteilen. Die untersuchte Gesamtzahl in Tabelle 5 ist geringer, da einzelne Anastomosen wegen zumeist schlecht erhaltener Struktur nicht zu beurteilen waren. Die Summe der relativen Häufigkeiten ist größer als 100%, da Mehrfachnennungen bei einer Anastomose möglich waren, z.B. eine Stauchung in Verbindung mit einer Nekrose.

TA B . 5: TABELLARISCHE HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN GEFÄßADAPTATIONEN

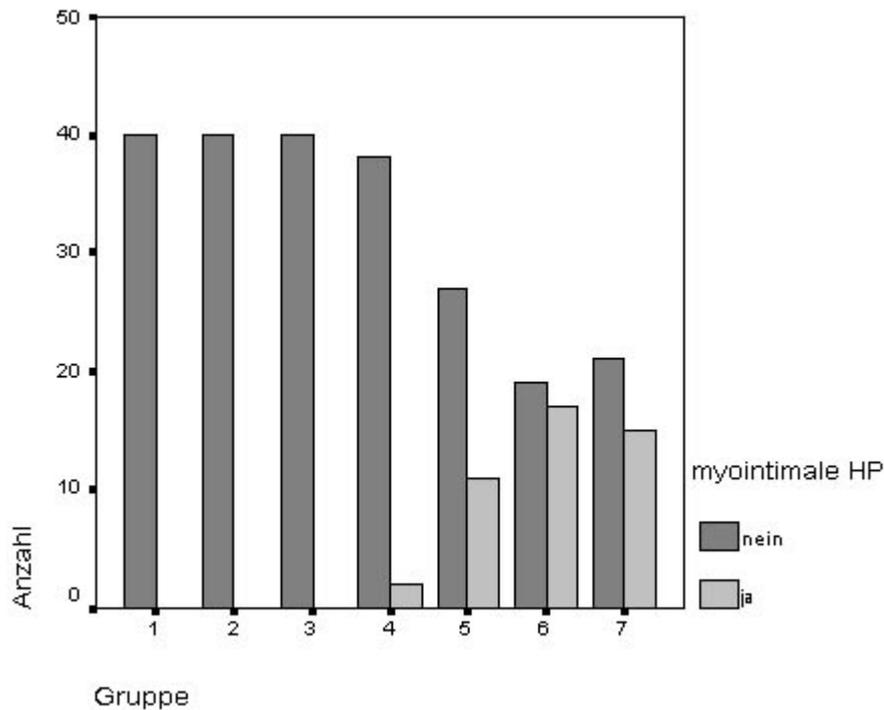
Appositionsform	untersuchte Gesamtzahl	Häufigkeit, absolut	Häufigkeit, relativ
Stauchung	268	127	47,4%
Versatz	268	86	32,1%
Nekrose	268	36	13,4%
Dehiszenz	267	31	11,6%
partielle Stoßapposit.	268	28	10,5%
Mediaeinriß	268	17	6,3%
Eversion	268	16	6%
Inversion	268	8	3%
Stoßapposition	268	6	2,2%
Aussackung	268	6	2,2%

DIAGR. 1: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER QUANTITÄT DER STUMPFAPPOSITION



Desweiteren wurde in allen Gruppen das Auftreten von myointimaler Hyperplasie untersucht (Diagramm 2). Die myointimale Hyperplasie tritt in Einzelfällen ab der vierten Gruppe (3 Tage postoperativ, 2 Fälle) auf. Häufig findet sie sich aber ab der 5. Gruppe (8 Tage postoperativ, 11 Fälle) und erreicht in der 6. Gruppe die maximale Häufigkeit mit 17 Fällen auf 36 untersuchten bzw. beurteilbaren Fällen (47,2% der beurteilbaren Anastomosen). Die Häufigkeit der myointimalen Hyperplasie nimmt im weiteren Verlauf nicht wieder ab. So lassen sich 6 Monate postoperativ immer noch in 41,6% der beurteilbaren Fälle (15 Fälle) myointimale Hyperplasien nachweisen.

DIAGR. 2: HÄUFIGKEIT DES AUFTRETENS VON MYOINTIMALEN HYPERPLASIEEN DISTAL DER ANASTOMOSE IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN

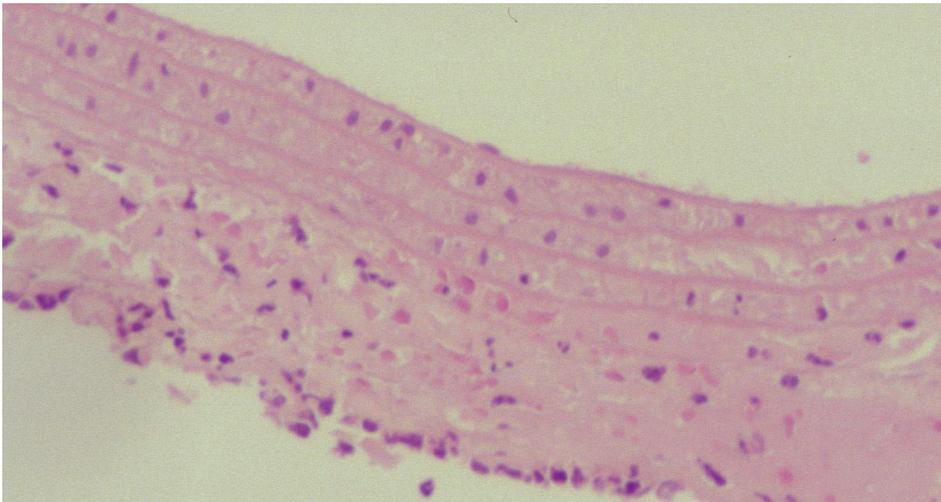


Konventionelle Bindegewebsfärbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die klassische histologische Färbung. Die schematische Darstellung eines Gefäßes in HE-Färbung ist bereits in Abbildung 1 gezeigt worden. Das Präparat der Abbildung 5 stellt auf den ersten Blick ein ebenfalls morphologisch unverändertes Gefäß dar. Zellkerne stellen sich blau dar, Zytoplasma und kollagene Fasern rot, elastische Fasern verschieden. Bei der genaueren Betrachtung fällt auf, daß an der luminalen Gefäßoberfläche sich im gesamten Ausschnitt nur ein Endothelzellkern befindet. Dieses Gefäß ist einem Tier 8 Stunden nach der Gefäßinterponation entnommen worden. Der dargestellte Ausschnitt zeigt das Interponat. Acht Stunden nach der Operation läßt sich kein intaktes Endothel im Interponat mehr nachweisen.

ABB. 5: HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG EINES INTERPONATES, ENTNOMMEN 8 STUNDEN POSTOPERATIV



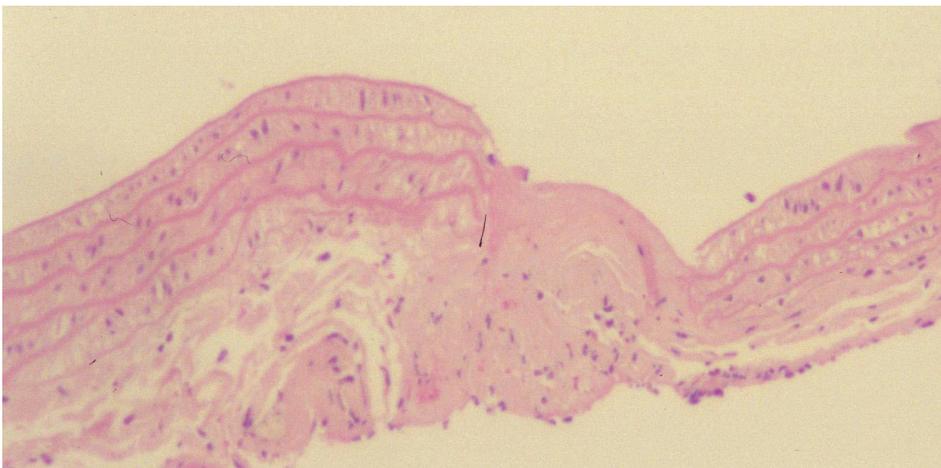
AB 2/4 HE

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

In Abbildung 6 zeigt sich bezüglich des Endothels die gleiche Situation bei einer Gefäßentnahme 24 Stunden nach dem Eingriff. Zusätzlich stellt sich hier eine deutliche Dehiszenz zwischen den beiden zu adaptierenden Gefäßstümpfen dar. Die Kontinuität des Gefäßes wird lediglich von einem fibrinösen Koagel gesichert. Im weiteren werden noch einige der oben beschriebenen Formen der Stumpfapposition im Bild gezeigt werden.

ABB. 6: DEHISZENZ 24 STUNDEN POSTOPERATIV (HE-FÄRBUNG)



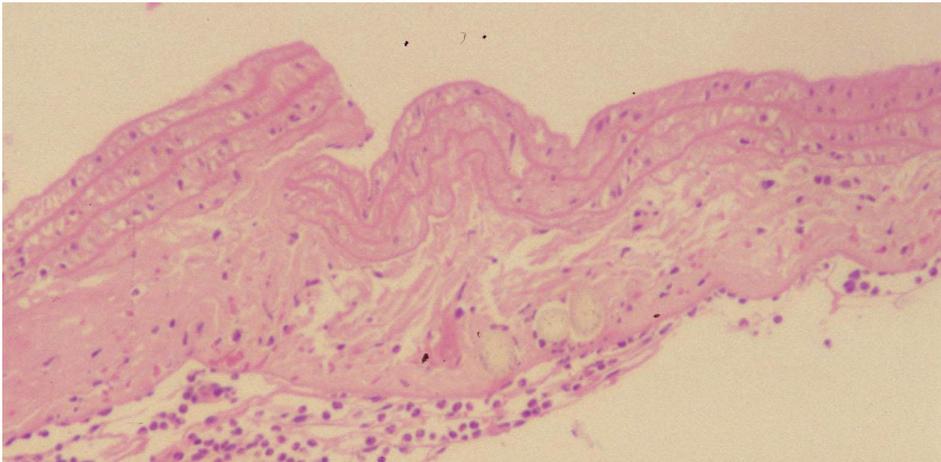
AB 3/5 HE

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

An einer weiteren Anastomose des gleichen Gefäßes (Abbildung 7) zeigt sich zum Beispiel eine milde Ausprägung der Stauchung als Appositionsform.

ABB. 7: MILDE STAUCHUNG 24 STUNDEN POSTOPERATIV



AB 3/5 HE

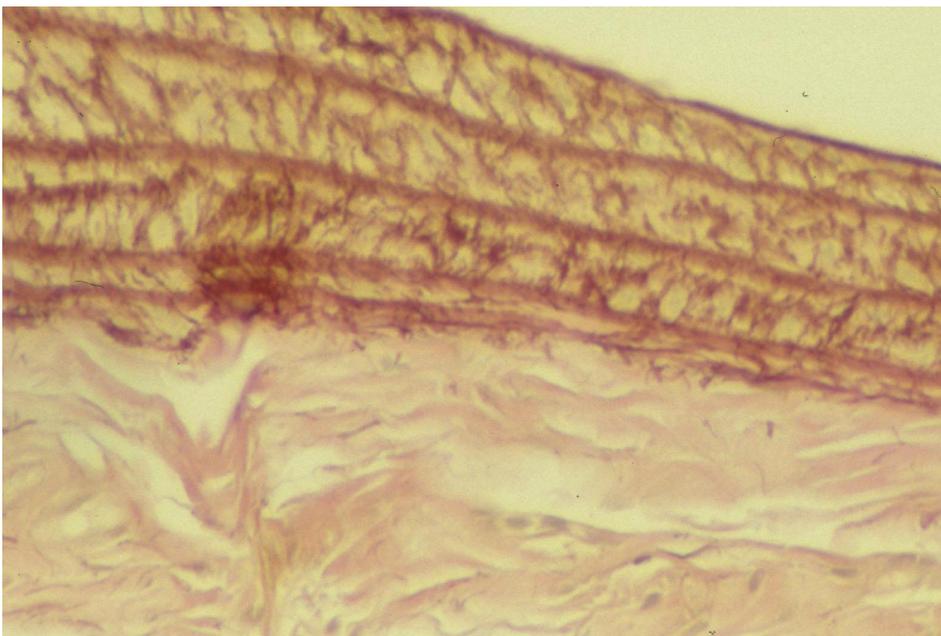
100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson Färbung stellt die zweite von uns durchgeführte konventionelle Bindegewebsfärbung dar. Die Bestandteile der Färbelösung sind Eisenhämatoxylin, Pikrinsäure und Fuchsinäure (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991). Wie in Abbildung 8 an einem unveränderten Gefäßwandanschnitt zu erkennen, färben die Zellkerne sich hier schwarzbraun, das Zytoplasma erscheint gelbbraun, kollagene Fasern erscheinen rot und elastische Fasern gelb. Insofern erlaubt die Elastica-van-Gieson-Färbung eine detailliertere Beurteilung des Gefäßbindegewebes.

ABB. 8: ELASTICA-VAN-GIESON FÄRBUNG AN UNVERÄNDERTER GEFÄßWAND



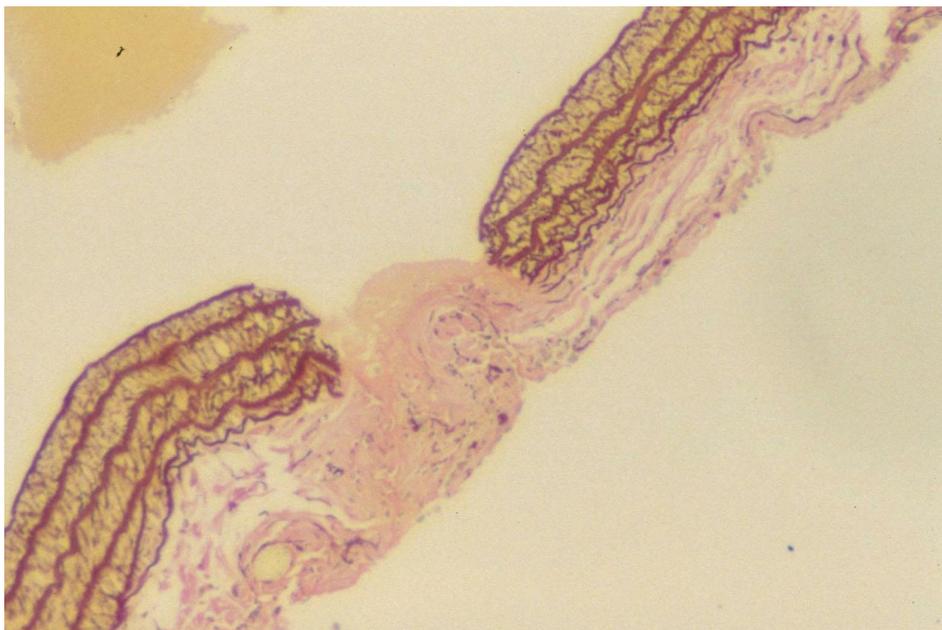
AB 7/4 EvG

200-fach;

f=6,7; 1/30 s

Die Abbildung 9 zeigt dieselbe Anastomose in der Elastica-van-Gieson-Färbung, die bereits in der Abbildung 6 in der HE-Färbung zu sehen war. In der Abbildung 9 im Vergleich zur Abbildung 6 fällt auf, dass im Dehiszenzbereich sich keine gelben oder roten Fasern darstellen. In der Abbildung 6 erscheint der Dehiszenzbereich lediglich als amorphe, rosafarbene Masse. Infolge der fehlenden kollagenen und elastischen Fasern lässt sich eine erhöhte Insuffizienzgefahr im Anastomosenbereich erkennen.

ABB. 9: DEHISZENZ 24 STUNDEN POSTOPERATIV (EVG-FÄRBUNG)



AB 3/5 EvG

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Im Bereich der Adventitia der unteren Anastomose der Abbildung 9 sieht man den Anschnitt eines Fadens. Insbesondere bei den Langzeitpräparaten lässt sich gelegentlich eine Fremdkörperreaktion um die Fadenanschnitte herum nachweisen.

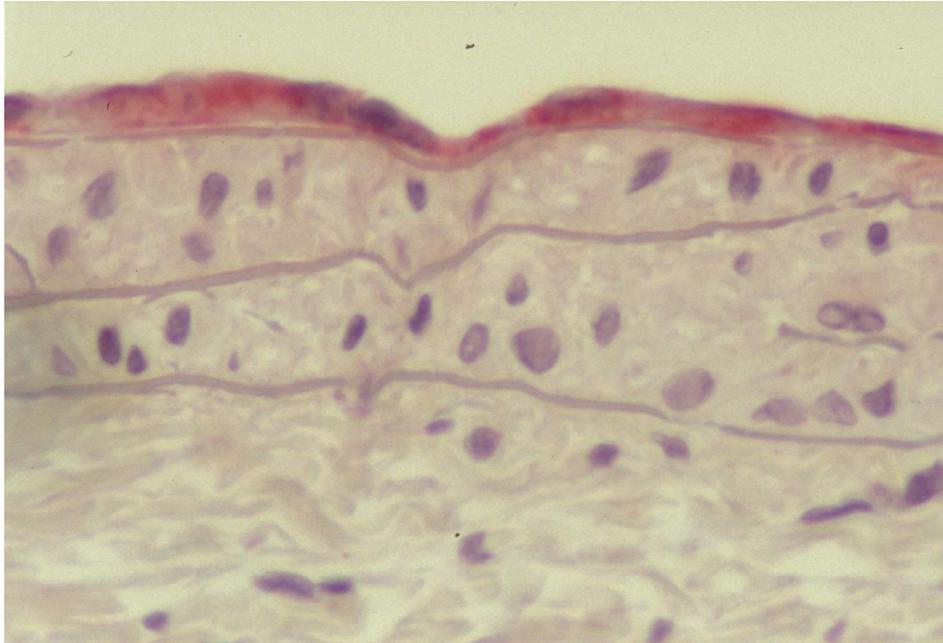
Immunhistochemische Färbungen

Von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der Von-Willebrand-Faktor (synonym vWF) ist vorhanden in ausdifferenzierten Endothelzellen und als größtes Protein im Plasma, insofern erscheint bei der Antikörperfärbung gegen den Von-Willebrand-Faktor funktionsfähiges Endothel positiv rot gefärbt. In Abbildung 10 ist positiv gefärbtes intaktes Endothel aus dem internen Kontrollbereich eines 8 Stunden postoperativ getöteten Tieres zu sehen. Als interner Kontrollbereich wurde bei allen Tieren der Bifurkationsbereich ausgewählt. Ein weiterer

Ausschnitt aus dem für Abbildung 10 verwendeten Gefäß zeigt ein total zerstörtes Endothel. Der Anschnitt der Abbildung 11 erfolgte aus dem zerstörten Interponatbereich.

ABB. 10: VON-WILLEBRAND-FAKTOR-POSITIVES ENDOTHEL IM BIFURKATIONSBEREICH



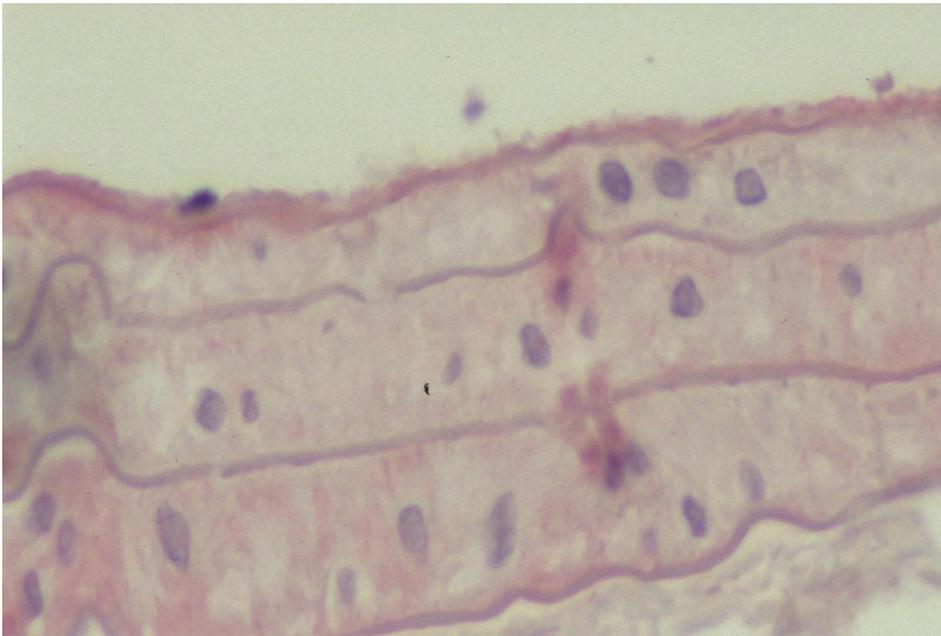
AB 2/9 vWF

400-fach;

f=6,7; 1/15 s

Infolge der durch die Gefäßinversion bedingten Zerstörung der Gefäßversorgung über die Vasa vasorum und der Unfähigkeit einer ausreichenden Diffusion von den Randbereichen her, kommt es zu einer vollständigen Zerstörung des Endothels im Interponatbereich und im Bereich der Anastomosen (Abbildung 11).

ABB. 11: ZERSTÖRTES ENDOTHEL IM INTERPONATBEREICH EINES 8-STUNDEN-TIERES NACH INTERPONATINSERTION



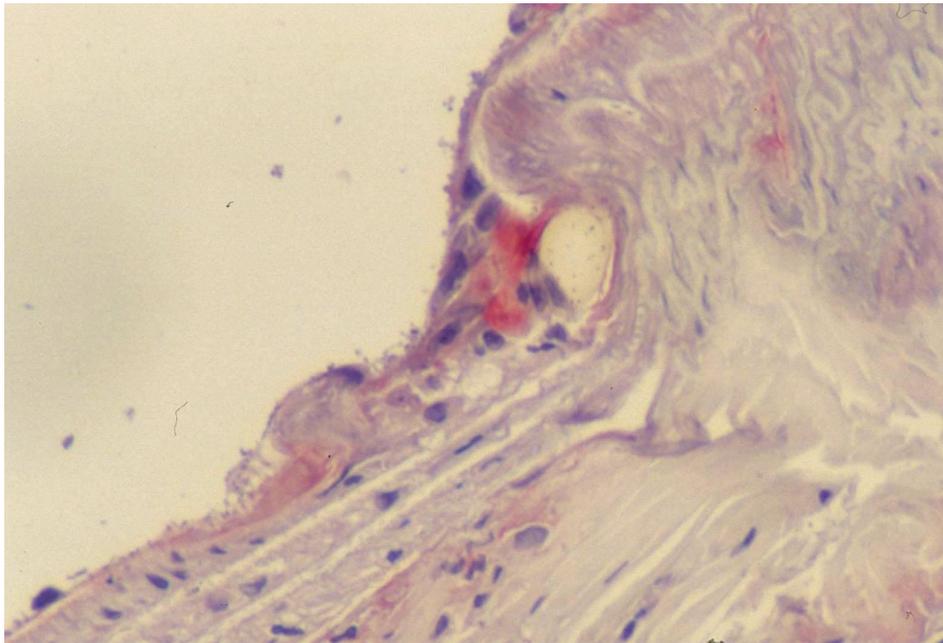
AB 2/9 vWF

400-fach;

f=6,7; 1/15 s

Der regelmäßige Nachweis von Von-Willebrand-Faktor-positiven Endothelzellen ist in unseren Präparaten frühestens an Gefäßen möglich, die eine Woche postoperativ entnommen wurden. Erste, vereinzelte Von-Willebrand-Faktor positive Gefäße lassen sich jedoch bereits bei Interponaten nachweisen, die 3 Tage postoperativ entnommen wurden (Diagramm 4). In Abbildung 12 lassen sich vereinzelte im subendothelialen Bereich in unmittelbarer Nähe zu einem Fadenanschnitt darstellen.

ABB. 12: ERSTE, VEREINZELTE VON-WILLEBRAND-FAKTOR POSITIVE ZELLEN IM ANASTOMOSENRANDBEREICH



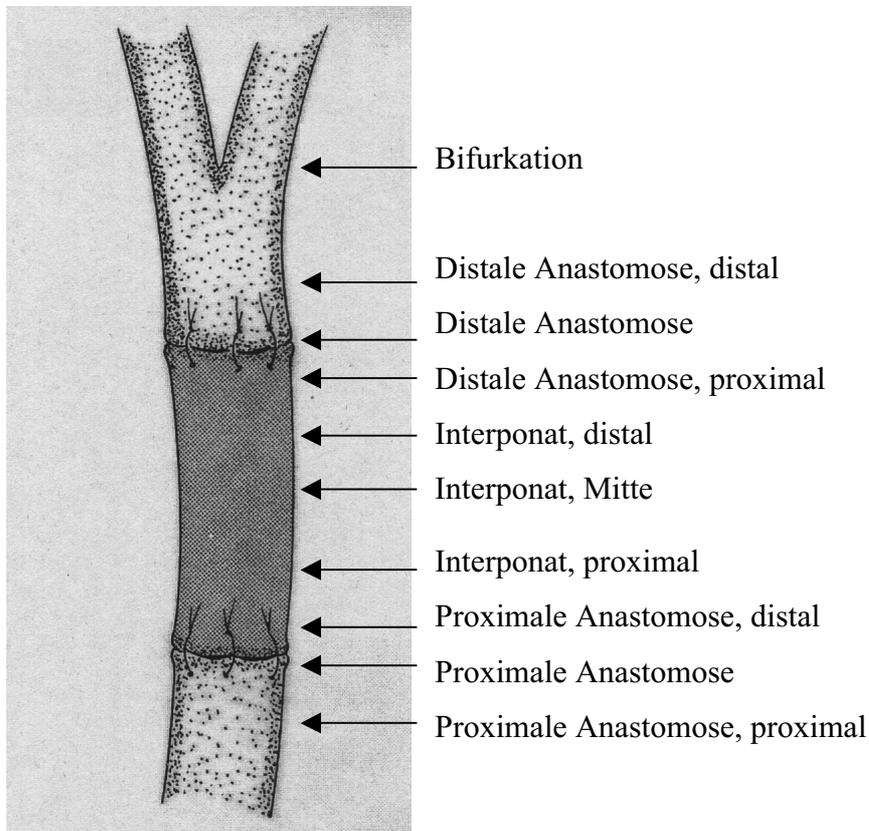
AB 4/2 vWF

200-fach;

f=6,7; 1/30 s

Bei der Auswertung der Von-Willebrand-Faktor-positiven Endothelfärbung haben wir den Gefäßverlauf und den Zeitpunkt der Gefäßentnahme berücksichtigt. Ein entnommenes Gefäß wurde an neun verschiedenen Stellen auf jeder Gefäßseite untersucht. Hierbei wurden jeweils die Anastomosen im Zentrum, sowie in den proximalen und distalen Randbereichen, sowie das Interponat im Zentrum und in den proximalen und mesialen Randbereichen beurteilt (Diagramm 3). Insgesamt wurde somit das Endothel an 18 verschiedenen Punkten pro Gefäß auf das Vorhandensein von Von-Willebrand-Faktor-positivem Endothel untersucht.

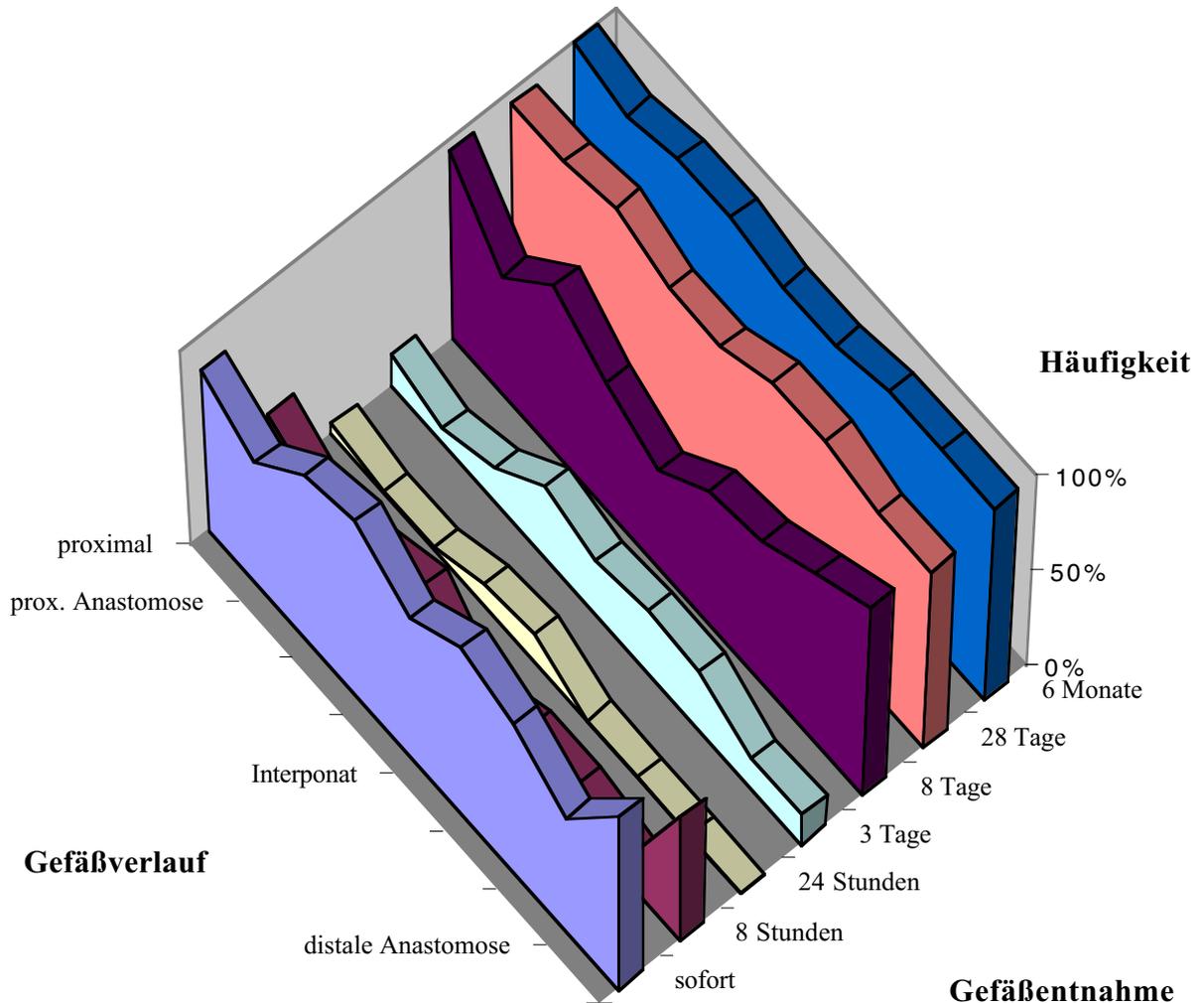
DIAGR. 3: ZEICHNERISCHE DARSTELLUNG EINES INTERPONATES MIT KENNZEICHNUNG DER EINZELNEN UNTERSUCHUNGSPUNKTE ZUR AUSWERTUNG DER ENDOTHELFÄRBUNG MIT ANTI-VON-WILLEBRAND-FAKTOR



Bei Betrachtung der Ergebnisse im einzelnen sieht man, daß in der Sofortgruppe mit Gefäßentnahme direkt postoperativ der Anteil der Von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße noch recht hoch ist. Insgesamt liegt er zumeist noch oberhalb von 80%, lediglich im Bereich zentral über den Anastomosen (65% und 62,5%) und im zentralen Interponatbereich (75%) liegt er niedriger (Diagramm 4, Tabelle 6). Im zeitlichen Verlauf kommt es zu einem starken Verlust der Färbhäufigkeit. Bei den Gefäßentnahmen 24 Stunden nach der Operation zeigt sich fast keine positive Färbung im beurteilten Gefäßverlauf mehr. Proximal der proximalen Anastomose sind dort noch 5,5% der untersuchten Gefäße positiv und im Verlauf des Interponates lassen sich in ungefähr 10% der Gefäße noch positive Zellen nachweisen. Die Gefäße, die drei Tage nach der Operation entnommen worden sind, zeigen im Interponatbereich und auch in den Randbereichen zu 15-30% positive Färbereaktionen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht zwangsläufig um ausdifferenzierte Endothelzellen, sondern oftmals handelt es sich um das frei im Plasma zirkulierende Von-Willebrand-Faktor-Protein, das sich in seiner unterstützenden Funktion in der Blutgerinnung an freiliegende, kollagene, subendotheliale Bindegewebsfasern angelagert hat.

DIAGR. 4: DARSTELLUNG DER HÄUFIGKEIT DES VON-WILLEBRAND-FAKTOR-POSITIVEN ENDOTHEL IN BEZUG ZUM ENTNAHMEZEITPUNKT UND ZUR LOKALISATION IM GEFÄßBEREICH

Von-Willebrand-Faktor-positives Endothel



Gefäße, die acht Tage nach der Interponatinserktion entnommen worden sind, zeigen bereits eine wiedergewonnene, deutlich häufigere positive Von-Willebrand-Faktor-Gefäßreaktion. So sind in den proximalen und distalen Randbereichen der Anastomosen der entnommenen Gefäße bereits nahezu 100% wieder positiv. Im zentralen Interponatbereich reagieren jedoch nur 50% der Gefäße positiv. Die Anastomosen und der bereits im Interponat gelegene Randbereich der Anastomosen färbt sich in ungefähr 80% der Fälle positive an. Anhand dieser Färbeverteilung liegt der Schluß nahe, daß eine Neubildung differenzierter Endothelzellen in den Randbereichen überwiegt, bzw. zeitlich zuerst stattfindet. Bei Betrachtung der 28 Tage nach der Operation entnommenen Gefäße zeigt sich, daß nahezu im

gesamten Gefäßverlauf eine 95-100%ige Gefäßpositivität vorliegt. Jedoch sind auch hier die Färbehäufigkeiten im zentralen Interponatbereich mit 89% etwas niedriger. Der Langzeitverlauf, die Gefäßentnahmen sechs Monate nach der Operation, zeigen hier keine wesentlichen neuen Erkenntnisse. Die Färbehäufigkeiten liegen zwischen 95% und 100%.

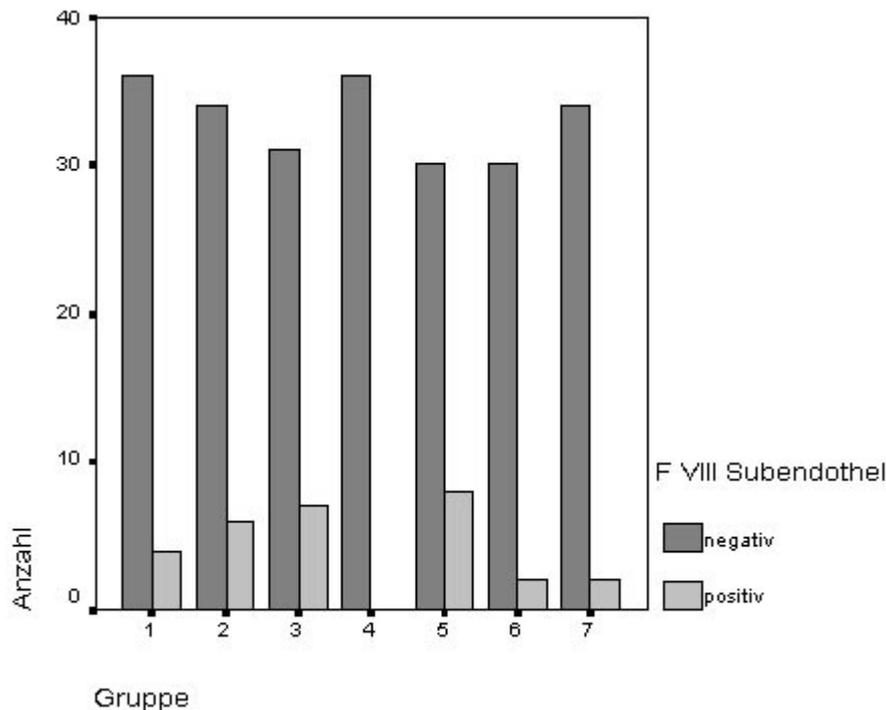
TAB. 6: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER HÄUFIGKEIT DES VON-WILLEBRAND-FAKTOR-POSITIVEN ENDOTHELIS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LOKALISATION AM GEFÄß UND DEM ZEITPUNKT DER GEFÄßENTNAHME

	Proximale Anastomose			Interponat			Distale Anastomose		
	Prox.	Mitte	Distal	Prox.	Mitte	Distal	Prox.	Mitte	Distal
sofort	82%	65%	88%	95%	75%	90%	81%	62,50%	94,40%
8 h	35,30%	20%	25%	35%	10%	20%	22%	14,30%	68,40%
24 h	5,50%	0%	0%	11%	15%	0%	0%	0%	0%
3 Tage	16,70%	8,30%	16,70%	37,50%	28,60%	33%	31%	15,40%	16,70%
8 Tage	95%	61%	85%	65%	50%	70%	74%	87%	100%
28 Tage	94%	94%	100%	89%	89%	100%	100%	93%	93%
6 Mon.	100%	93%	100%	100%	94%	94%	100%	100%	100%

Desweiteren haben wir auch Färbereaktionen in tieferen Schichten untersucht. Hier wurden regelmäßig nur die einzelnen Anastomosen und das Interponat beidseitig beurteilt. Es wurden somit drei Meßpunkte pro Gefäßseite, bzw. 6 Meßpunkte pro Gefäß ausgewertet. Die interessanten Ergebnisse werden in den folgenden Auswertungen präsentiert. Eine Gesamtübersicht mit einer Zusammenstellung aller Ergebnisse erfolgt am Ende des Auswertungsteiles. Wir möchten bei der anti-Von-Willebrand-Faktor-Färbung die Reaktionen im Bereich des Subendothels und im Bereich der Adventitia vorstellen. Diagramm 5 zeigt das Vorkommen von Von-Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Bereich des Subendothels der Anastomosenregion. Nennenswerte Färbehäufigkeiten (>10% der zu beurteilenden Anastomosenbereiche positiv) treten dort nur in den Gruppen 2,3 und 5 auf. In den Gruppen 2 (Gefäßentnahme 8 Stunden postoperativ) und 3 (Gefäßentnahme nach 24 Stunden) läßt sich die teilweise Von-Willebrand-Faktor-Positivität dadurch erklären, daß der Von-Willebrand-Faktor das größte Plasmaprotein darstellt und die Eigenschaft hat, sich an freiliegende subendotheliale Oberflächen anzulagern. Insofern ist in den Gruppen 2 und 3 davon

auszugehen, daß man dort angelagertes Von-Willebrand-Faktor-Plasmaprotein nachgewiesen hat. In der Gruppe 4 (Gefäßentnahme nach 3 Tagen) ließen sich leider keine Von-Willebrand-Faktor-positiven Zellen nachweisen. Eine Erklärung dafür haben wir nicht. Die Häufigkeit des Von-Willebrand-Faktor-Nachweises im Subendothel ist in der Gruppe 5 mit 21% am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt (eine Woche nach der Operation) ist in 60% bis 80% der untersuchten Anastomosen der Von-Willebrand-Faktor bereits im Endothel der Anastomosenbereiche nachzuweisen. Insofern könnte ein Vorkommen im subendothelialen Bereich einen Hinweis geben auf den Differenzierungsweg des Neoendothels.

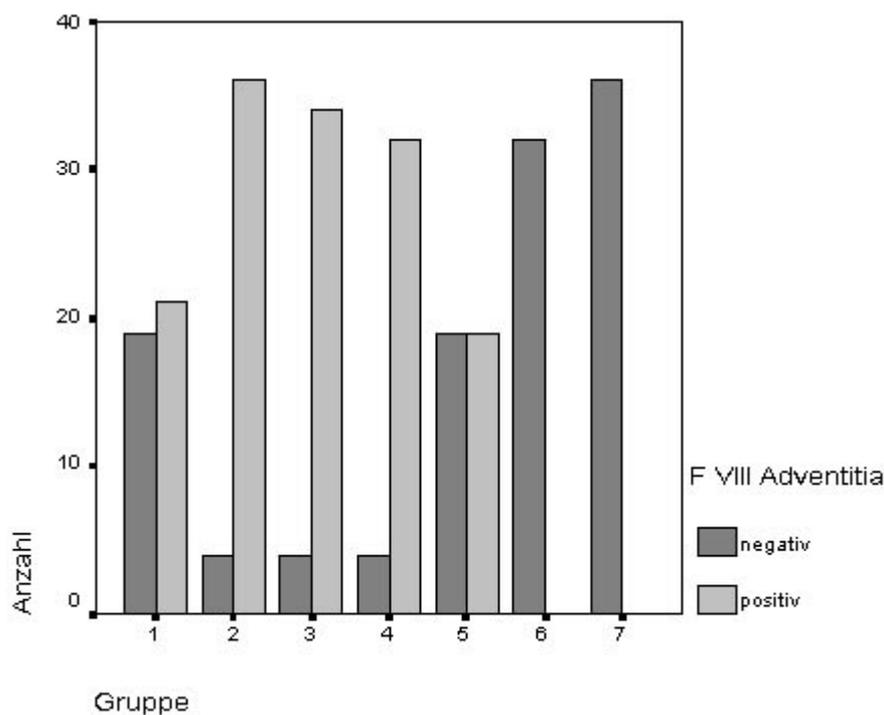
DIAGR. 5: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN VON-WILLEBRAND-FAKTOR-SUBENDOTHELFÄRBUNG IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Die Häufigkeit des Auftretens von Von-Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Bereich der Adventitia der Anastomosen wurde in Diagramm 6 erfasst. Positive Färbungen im Adventitiabereich lassen sich nur in den ersten fünf Gruppen darstellen. Hierbei finden sich die Färbungen typischerweise beidseitig im lateralen Anastomosenbereich (siehe auch Abbildung 17). Im einzelnen waren in der 1. Gruppe 52,5%, in der 2. Gruppe 90%, in der 3. Gruppe 89%, in der 4. Gruppe 88% und in der 5. Gruppe 50% der untersuchten Anastomosen positiv. Es ist auffällig, daß bei den mittleren Gruppen, also in den Phasen, wo luminal kein

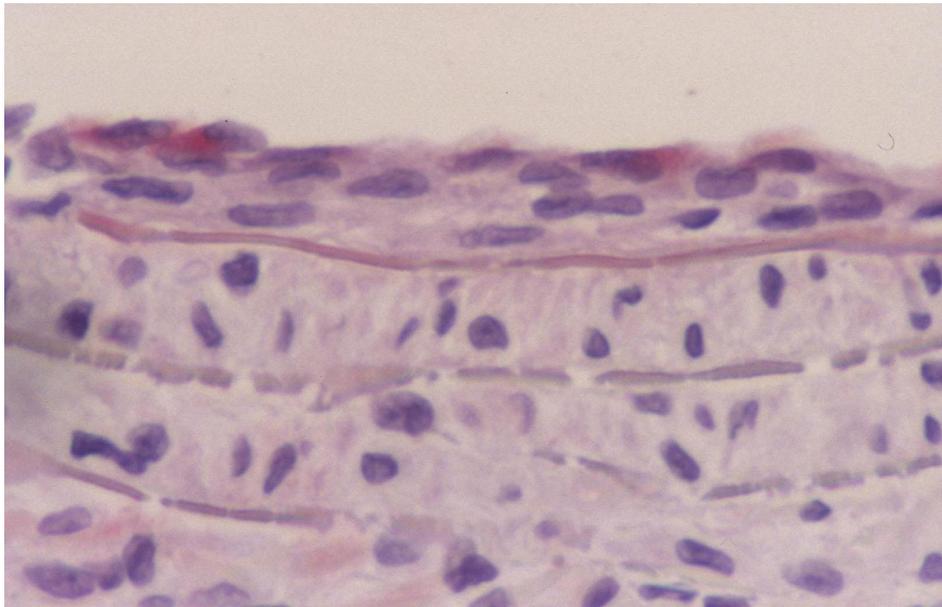
Endothel vorhanden ist, sehr häufig positive Befunde im Bereich der Adventitia zu finden sind. Diese Befunde können zum einen den Neokapillarisationen im Rahmen der Granulationsgewebsbildung in der Wundheilung entsprechen, zum anderen könnte die Adventitia mit ihrem Potential an pluripotenten Zellen das Zellreservoir für neue luminalen Zellen darstellen. Dafür würden auch die frühzeitig zahlreich nachweisbaren positiven Zellen in der Adventitia sprechen (ab 8 Stunden postoperativ in um die 90% aller untersuchten Anastomosen, siehe Diagramm 6).

DIAGR. 6: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN VON-WILLEBRAND-FAKTOR-FÄRBUNG DER ADVENTITIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



In Abbildung 13 stellen sich an einem nach einer Woche postoperativ entnommenen Gefäß im Bereich einer schwachen myointimalen Hyperplasie einzelne, an der luminalen Oberfläche lokalisierte, positive Zellen dar.

ABB. 13: EINZELNE DIFFERENZIERTE ENDOTHELZELLEN BEI SCHWACHER MYOINTIMALER HYPERPLASIE



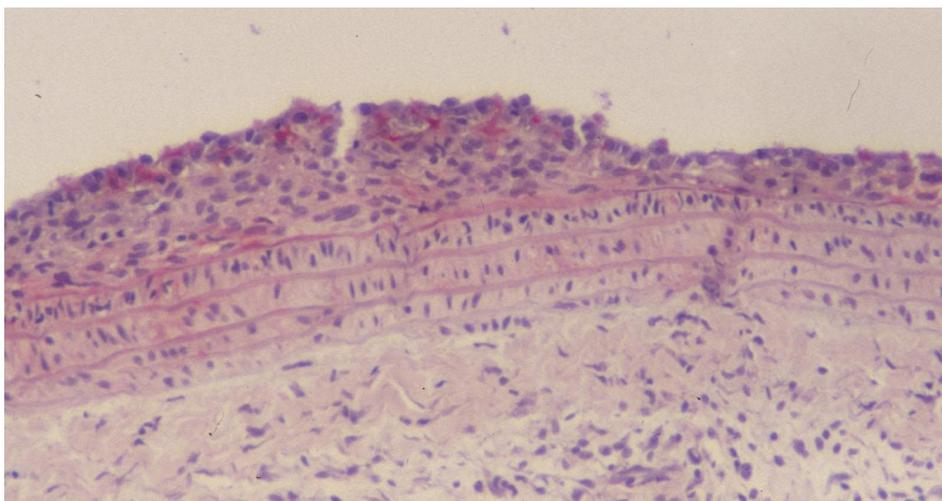
AB 5/3 vWF

400-fach;

f=6,7; 1/15 s

Abbildung 14 stellt die gleiche Situation an einem weiteren 8 Tage postoperativ entnommenen Gefäß dar. Hier finden sich ebenfalls vereinzelte positive, zumeist luminal lokalisierte Endothelzellen innerhalb einer starken myointimalen Hyperplasie.

ABB. 14: POSITIVE, DIFFERENZIERTE ENDOTHELZELLEN IN STARKER MYOINTIMALER HYPERPLASIE



AB 5/4 vWF

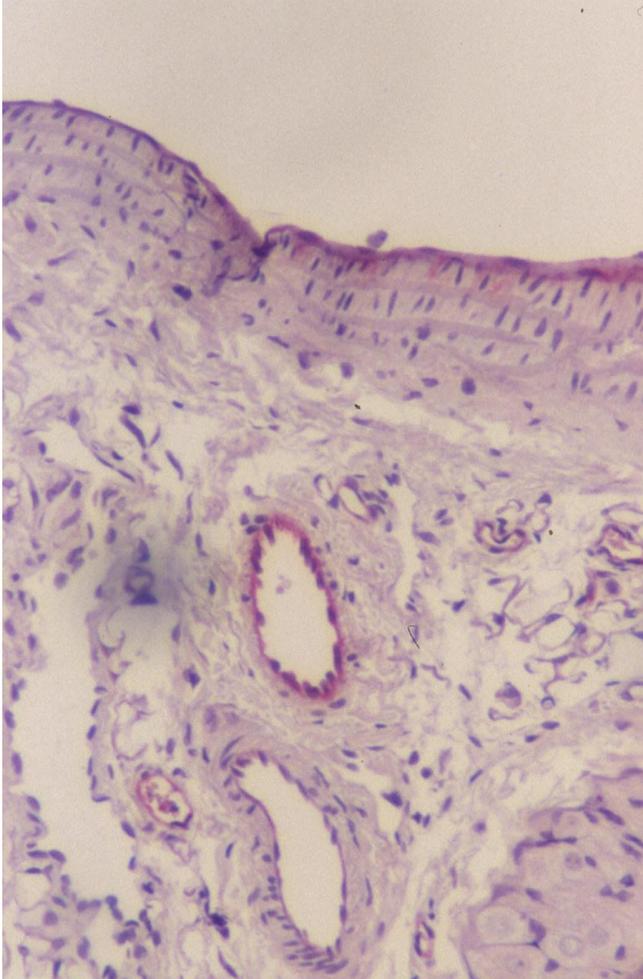
100-fach;

f=6,7; 1/30 s

In Abbildung 15 stellt sich zum einen, ebenfalls bei einem 8 Tage postoperativ entnommenem Gefäß, ein neues Neendothel luminal im Bereich der Anastomose dar, zum anderen stellen sich hier im Sinne einer internen Kontrolle positive Gefäßendothelien bei den Vasa vasorum in den tieferen Schichten der Adventitia dar. Da diese jedoch auch nur zum Teil positiv

reagieren, kann man vermuten, daß es sich hier zum Teil um Gefäßneubildungen im Rahmen des Wundheilungsprozesses handelt.

ABB. 15: POSITIVE LUMINALE ENDOTHELZELLEN UND BEGLEITENDE VASA VASORUM



AB 5/3 vWF

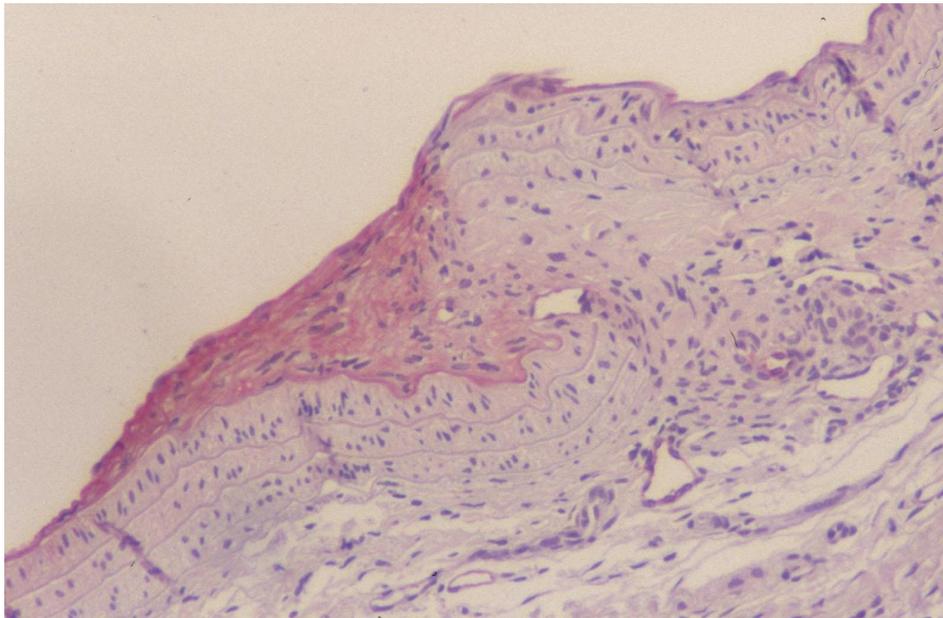
Neue, Von-Willebrand-Faktor-positiv differenzierte Endothelzellen im Anastomosenbereich bei Gefäßentnahme eine Woche postoperativ. Auffällig hier ebenfalls die Von-Willebrand-Faktor positiven Vasa vasorum unterhalb der Anastomose.

Bei den färbeneutralen Gefäßlumina handelt es sich möglicherweise um im Rahmen der Granulationsphase neu entstehende Gefäße, die noch nicht über ein ausdifferenziertes Endothel verfügen.

100-fach; f=6,7; 1/30 s

Die Abbildung 16 zeigt seitens der Gefäßapposition eine Kombination aus einem Versatz und einer milden Stauchung. Das Präparat wurde 28 Tage nach Durchführung der Operation entnommen. Die zu erwartende luminal Stufenbildung ist komplett von einer endothelialen, bzw. myoendothelialen Neubildung überbrückt worden. Dieses vielschichtige neue Endothel ist nahezu vollständig Von-Willebrand-Faktor positiv. Auch in diesem Fall zeigt sich die intensivste Färbereaktion an den mehr luminal lokalisierten Endothelzellschichten. Die Adventitia erscheint bei allen diesen Gefäßen negativ.

ABB.16: STARK POSITIV REAGIERENDE ENDOTHELZELLEN BEI EINEM 28 TAGE POSTOPERATIV ENTNOMMENEM GEFÄß



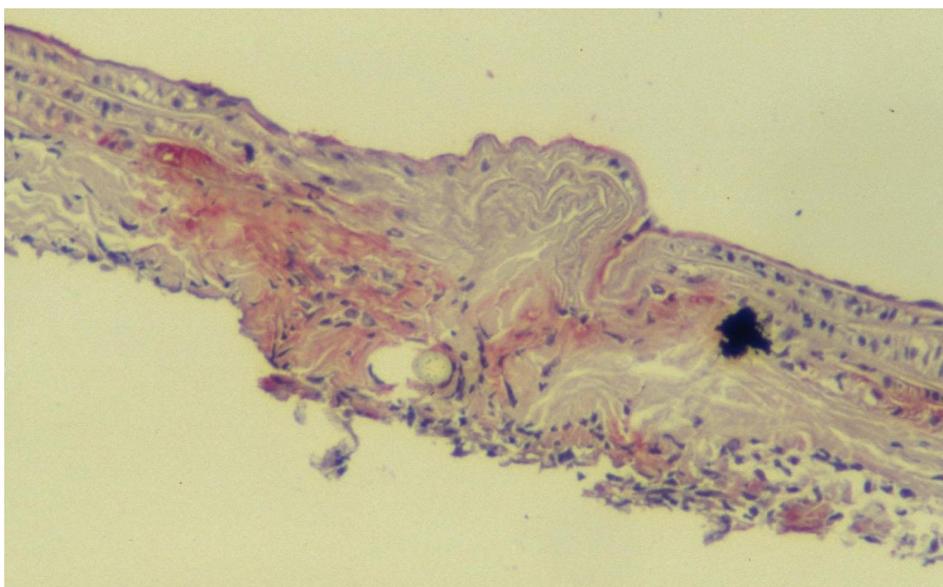
AB 6/7 vWF

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Als Beispiel für eine positiv reagierende Adventitia dient die bereits bei der zahlenmäßigen Auswertung angeführte Abbildung 17. Hierbei handelt es sich um ein Gefäß, das drei Tage postoperativ entnommen worden ist. In dieser frühen Phase der Wundheilung kommt es, wie bei der numerischen Auswertung bereits angeführt, zu häufigen positiven Reaktionen im Bereich der Adventitia.

ABB. 17: POSITIVE ADVENTITIA BEI EINEM DREI TAGE POSTOPERATIV ENTNOMMENEM GEFÄß



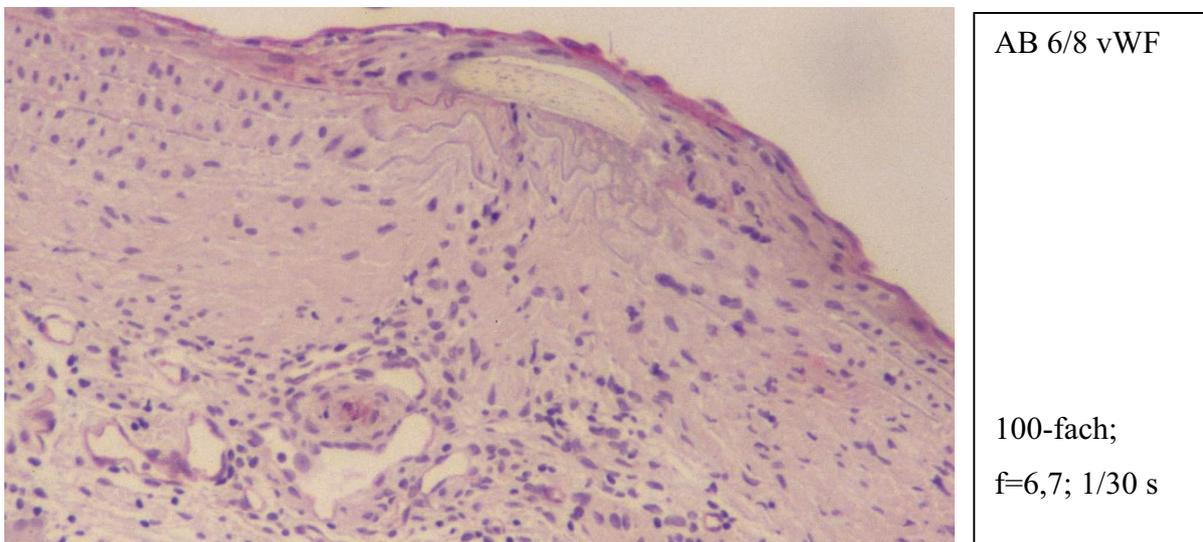
AB 4/10 vWF

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Die letzte Abbildung (Abbildung 18) im Rahmen der Auswertung des Nachweises von Von-Willebrand-Faktor in Endothelien stellt nochmals die Anpassungsfähigkeit der luminalen Endothelauskleidung dar (siehe auch Abbildung 16). Es handelt sich dabei um eine 28 Tage nach der Operation entnommene Anastomose. Oberhalb der partiellen Apposition der Gefäßstümpfe stellt sich nach luminal ein Fadenanschnitt dar. Dieser ist beidseitig von myoendothelialelem Gewebe eingefasst worden und ist von einer Von-Willebrand-Faktor positiven Endothelschicht überzogen.

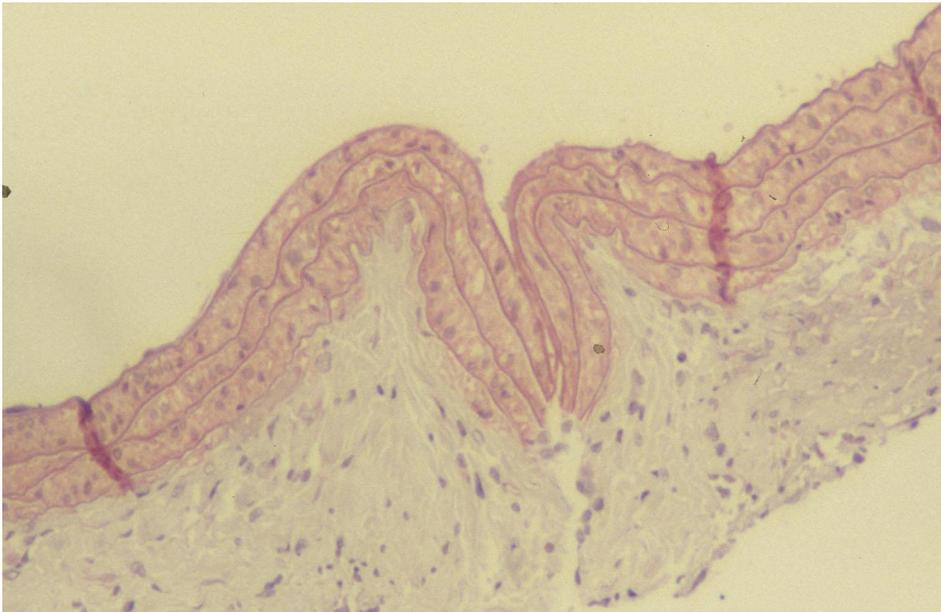
ABB. 18: GESCHLOSSENE VON-WILLEBRAND-FAKTOR-POSITIVE ENDOTHELDECKE ÜBER NAHTMATERIAL



Laminin

Laminin ist als Protein der Extrazellulärmatrix vorwiegend im Bereich der Media und der Basalmembran der Gefäße lokalisiert (Abbildung 19). Es läßt sich immunhistochemisch kräftig darstellen und man erkennt leicht bei den Anastomosen die Nahtstelle infolge einer Unterbrechung des Mediaverlaufes. Auch hier führt eine atraumatische Appositionstechnik zu nur geringen Unterbrechungen, hier dargestellt am Beispiel einer Gefäßseversion.

ABB. 19: LAMININ-POSITIVE MEDIA BEI GEFÄSSEVERSION



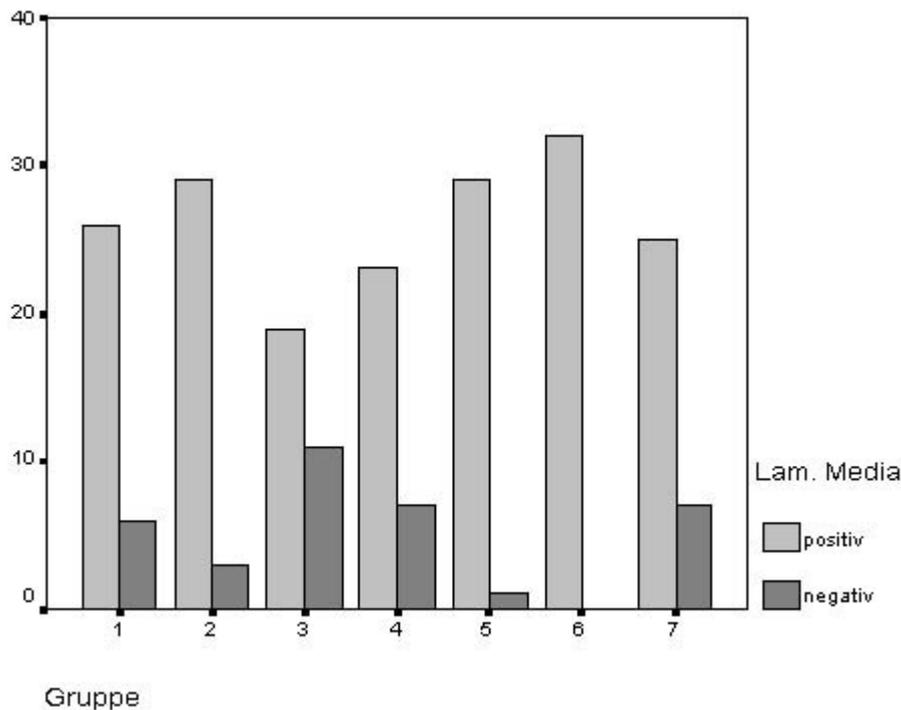
AB 4/8 Lam.

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

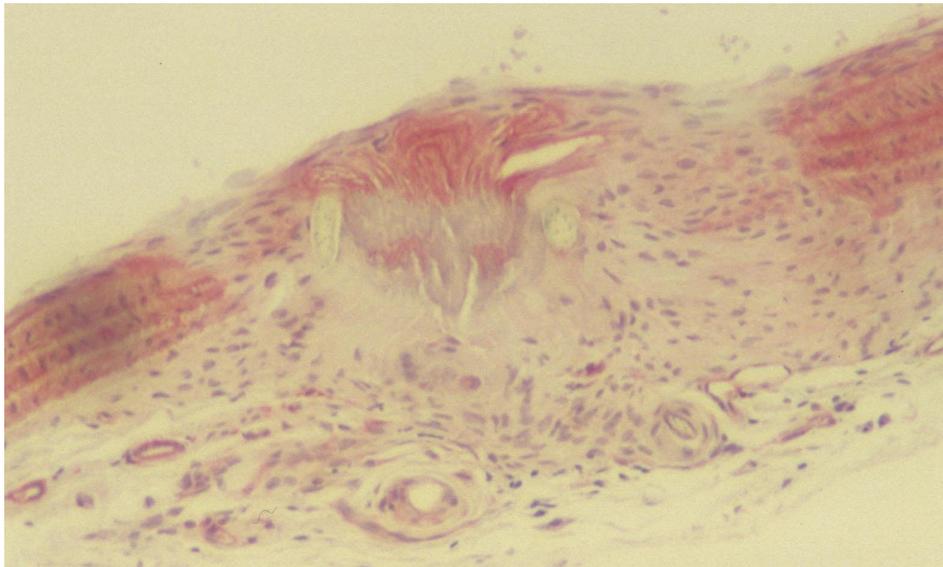
Im Rahmen der Auswertung der positiven Laminin-Färbung innerhalb der Media im Verlauf der einzelnen Nachbeobachtungsabschnitte fällt 3- und 8-Tage postoperativ ein Abfall der Laminin-positiven Mediafärbung im Anastomosenbereich auf (Diagramm 7). Bei Entnahme am 3.Tag postoperativ sind nur 50% der untersuchten Gefäße Laminin-positiv. Auch sind nach 6 Monaten lediglich 78% aller untersuchten Präparate im Anastomosenbereich in der Media Laminin-positiv.

DIAGR. 7: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN ANTI-LAMININ-FÄRBUNG DER MEDIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Die Abbildung 20 stellt den Anastomosenbereich nach dem sechs-monatigen Nachbeobachtungsintervall dar. Als Appositionsform hat hier ehemals wahrscheinlich eine Stauchung vorgelegen. Hier ist es im Verlauf zu Nekrosebildungen im Anastomosenbereich gekommen. Ein neues Ersatzgewebe hat sich gebildet. Insbesondere in den lateralen Anteilen der Anastomose konnte eine Restitutio ad integrum nicht stattfinden und das unspezifische Ersatzgewebe zeigte keine oder nur weit verminderte Syntheseleistung von Laminin.

ABB. 20: WEITGEHEND LAMININ-NEGATIVE MEDIA BEI EINEM 6 MONATE POSTOPERATIVEM TIER



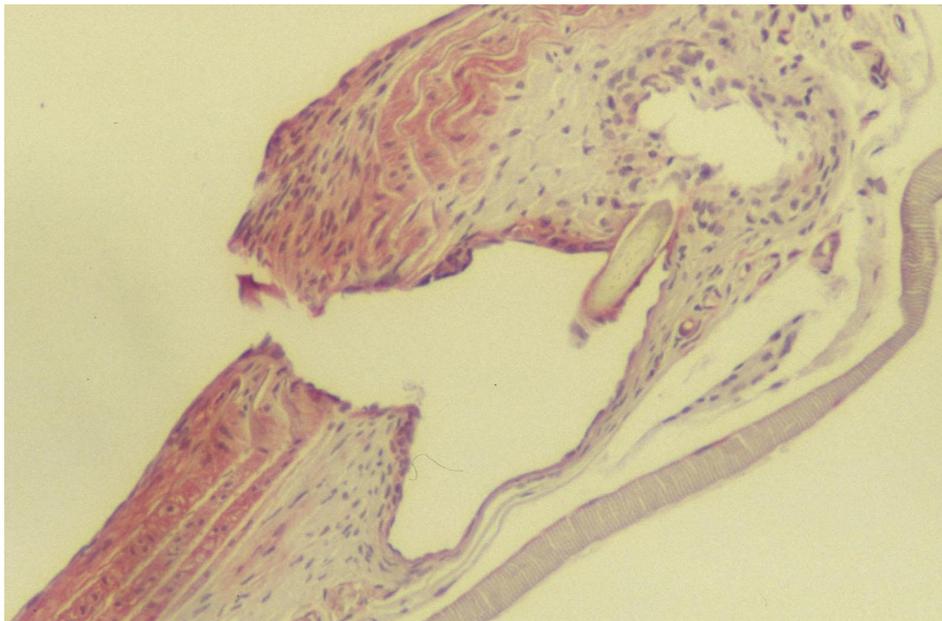
AB 7/1 Lam.

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Die Abbildung 21 stellt ein weiteres Beispiel für eine Laminin-negative Media im Langzeitverlauf dar. In diesem Anastomosenbereich ist es, möglicherweise als Folge einer verminderten Stabilität bei einem Kollagen III-Mangel, zu der Bildung eines falschen Aneurysmas gekommen. Im Wandbereich des Aneurysmas stellt sich ebenfalls noch ein Fadenanschnitt dar. Es gibt in diesem Anastomosenbereich keine umgrenzende Media mehr und es kommt lediglich in den lateralen Bereichen zu einer feinen subendothelialen Anreicherung von Laminin-positivem Gewebe. Im Bodenbereich der Aussackung läßt sich kein Laminin-positives Gewebe mehr abgrenzen.

ABB. 21: AUSSACKUNG IM ANASTOMOSENBEREICH 6 MONATE POSTOPERATIV



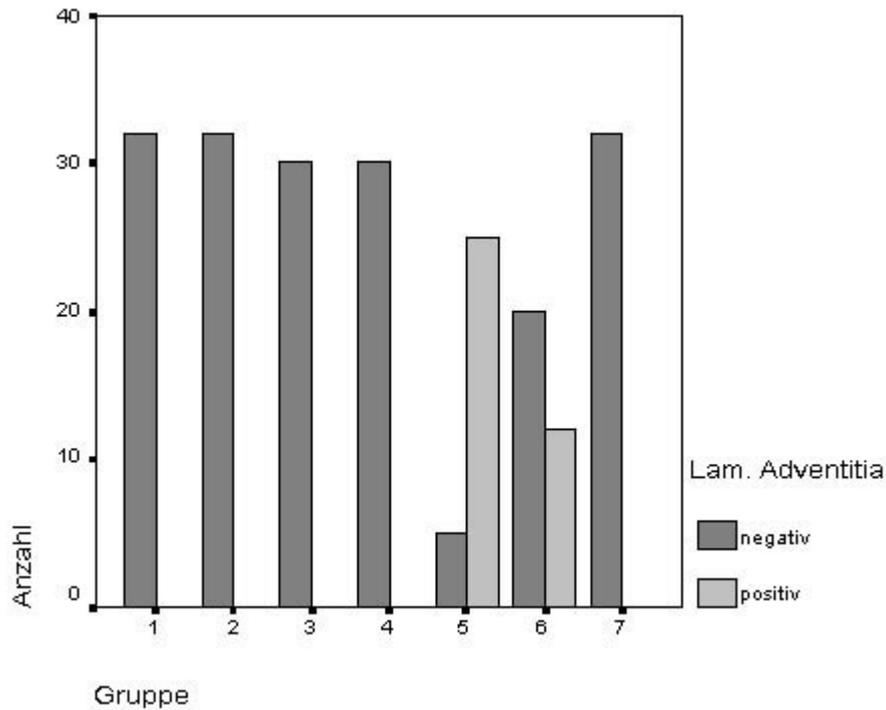
AB 7/10 Lam.

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

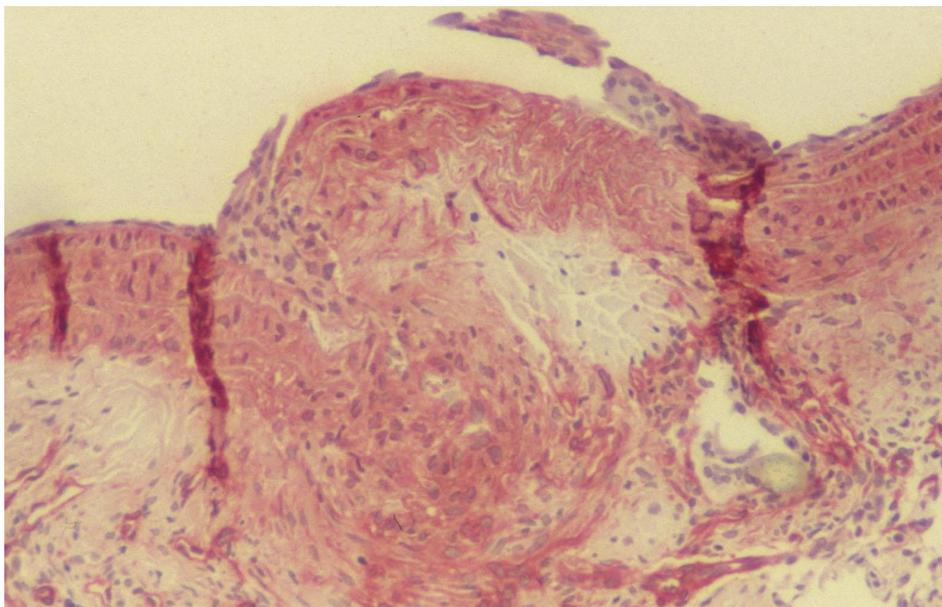
Im unveränderten Gefäß kommt es nicht zu einer Färbung der Adventitia im Rahmen der anti-Laminin-Färbung. Bei Beurteilung der unterschiedlichen Nachbeobachtungsintervalle finden sich in den mittleren Gruppen positive Reaktionen im Bereich der Adventitia. Bei der Gefäßentnahme 8 Tage nach der Operation finden sich in 83% aller untersuchten Präparate positive Reaktionen im Adventitiabereich. Bei der Gefäßentnahme 28 Tage nach der Operation finden sich ebenfalls immerhin noch in 37,5% positive Mitreaktionen im Bereich der Adventitia. Dargestellt sind diese Befunde im Diagramm 8 in der graphischen Verteilung und in der Abbildung 22 als Bildbeispiel.

DIAGR 8: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN ANTI-LAMININ-FÄRBUNG DER ADVENTITIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Die Abbildung 22 zeigt eine 8 Tage nach der Operation entnommene Gefäßanastomose. Im Bereich der Versatzbildung zwischen den Gefäßstümpfen zeigt sich eine deutliche Färbereaktion.

ABB. 22: LAMININ POSITIVE ADVENTITIA EINE WOCHE POSTOPERATIV



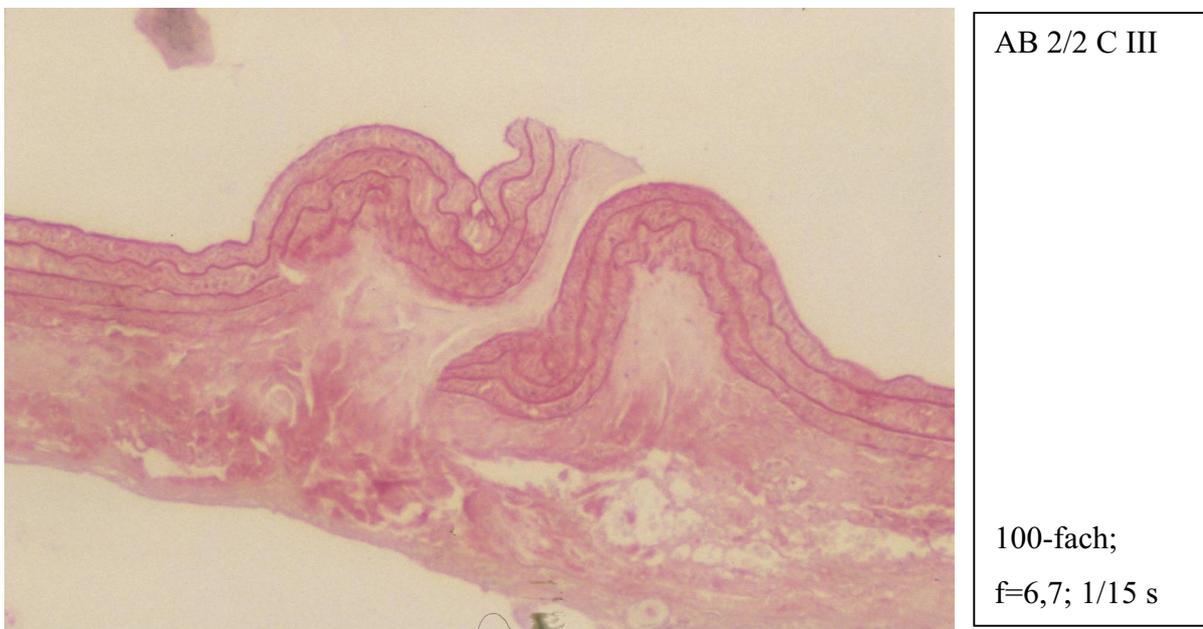
AB 5/3 Lam.

100-fach;
f=6,7; 1/30

Kollagen III

Kollagen III als Protein der Extrazellulärmatrix dient in hohem Maße der mechanischen Stabilisierung des jeweiligen Gewebes. Kollagen III lagert sich um und entlang der elastischen Fasern. In der Media sind diese vor allem oberhalb und unterhalb von Muskelzellagen lokalisiert (siehe auch Abbildung 8 in Elastica-van-Gieson Färbung). Diese Muskelzellagen werden auch als lamelläre Einheiten bezeichnet. Das entstehende Bild im Längsschnittpräparat vermittelt den Eindruck einer Sandwichstruktur (CORNELISSEN et al. 2000). Diese ist an dem gestauchten, acht Stunden postoperativ entnommenen Gefäß in Abbildung 23 zu sehen.

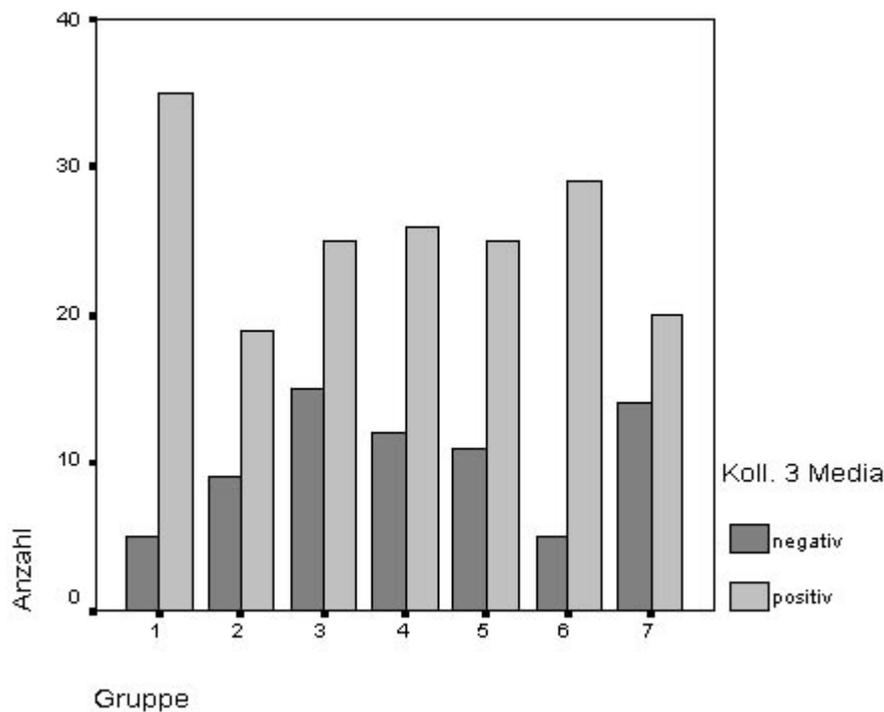
ABB. 23: TYPISCHE SANDWICHSTRUKTUR DER MEDIA IN DER KOLLAGEN III-FÄRBUNG



Bei Beurteilung der Mediafärbung mit Kollagen III im Verlauf der einzelnen Gruppen (Diagramm 9), sieht man, daß sie zu den späteren Gruppen hin abnimmt. Hierbei fällt nur die 28-Tage-Gruppe etwas aus dem Rahmen, in der Beurteilung 6 Monate postoperativ sind nur 58,8% der beurteilten Gefäße Kollagen III positiv, direkt postoperativ waren 87,5% der beurteilten Gefäße positiv. In den anderen Gruppen waren jeweils 60-70% Kollagen III positiv. Zur Folge hat dieser Abfall eine Schwächung der Organstruktur des Gefäßes. Unser Erklärungsmodell fußt auf Veränderungen in der Media und Adventitia insbesondere bei Gefäßen, die keine ideale Appositionsform zeigen. Bei Präparat AB 2/2 aus Abbildung 23 besteht eine stärkere Stauchung an den beiden Gefäßenden. Hierdurch kommt es infolge von Minderdurchblutungen innerhalb der Adventitia, infolge, zum Beispiel, von Zugspannungen,

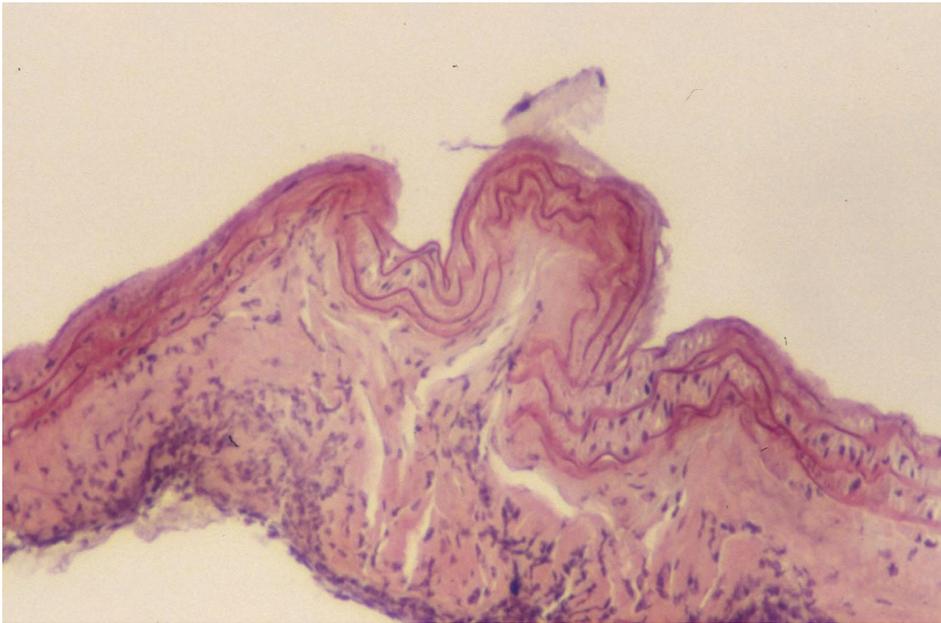
zu Nekrosebildungen in der Adventitia. Histologisch sind diese zu erkennen durch hyaline, aufgequollene Zellen mit einem blassen oder nicht sichtbarem Zellkern. Die Media ist bei dieser Ausprägung in diesem Stadium noch nicht betroffen.

DIAGR. 9: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN ANTI-KOLLAGEN-III-FÄRBUNG DER MEDIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Ein weiteres Beispiel für diese adventitiellen Nekrosen infolge von Stauchungen zeigt die Abbildung 24 an einem 24 Stunden postoperativ entnommenen Gefäß. Im weiteren Verlauf

ABB. 24: ADVENTIELLE NEKROSEN 24 STUNDEN POSTOPERATIV

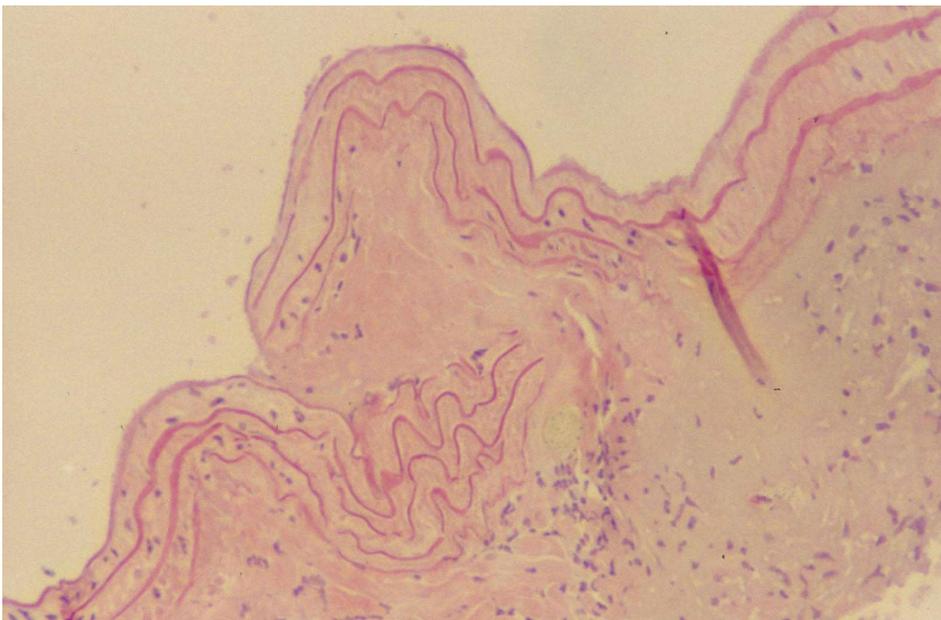


AB 3/1 C III

100-fach;
f=6,7; 1/30 s

kann die Versorgung der Media nicht mehr sichergestellt werden. Seitens der Adventitia erfolgt keine Sauerstoff- oder Nährstoffzufuhr. Eine Ernährung der Media von den Seiten oder vom Lumen aus über Diffusion kann ebenfalls nicht die Mediaversorgung sicherstellen. Insofern kommt es im Verlauf zu medialen Nekrosebildungen (Abbildung 25) mit folglichem Verlust der extrzellulären Matrixproteine.

ABB. 25: MEDIALE NEKROSEBILDUNGEN DREI TAGE POSTOPERATIV

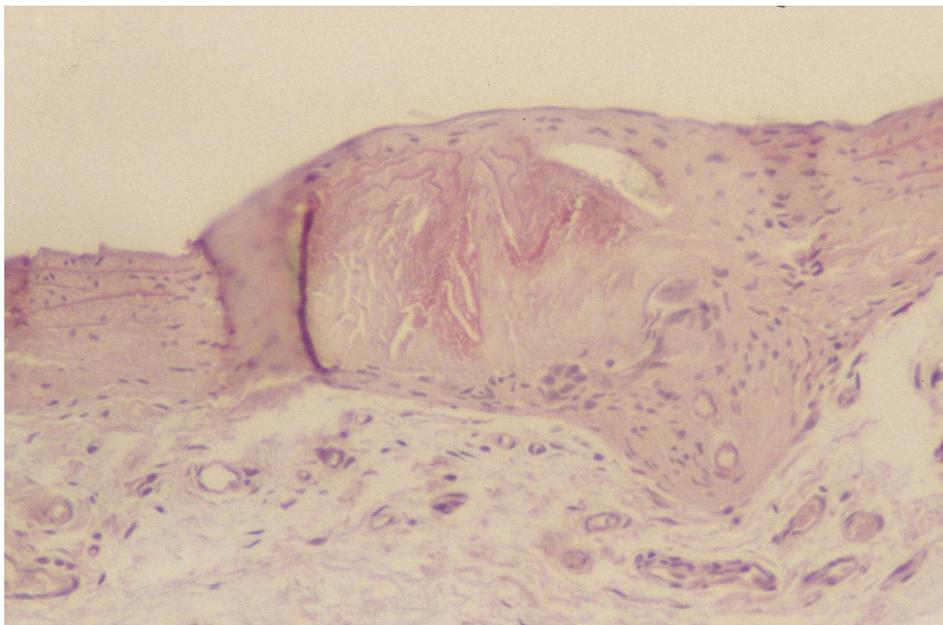


AB 4/1 C III

100-fach;
f=6,7; 1/30 s

Im Langzeitverlauf hat dieses zur Folge, daß die komplexe Struktur der Media keine restitutio ad integrum erfährt und es dort zu einer Defektheilung kommt (Abbildung 26). Langfristig bedeutet dieses eine herabgesetzte Gefäßfestigkeit. Das Auftreten von Aussackungen (Abbildung 21) und Gefäßinsuffizienzen ist begünstigt.

ABB. 26: GERINGER MEDIALER KOLLAGEN-III GEHALT 6 MONATE POSTOPERATIV



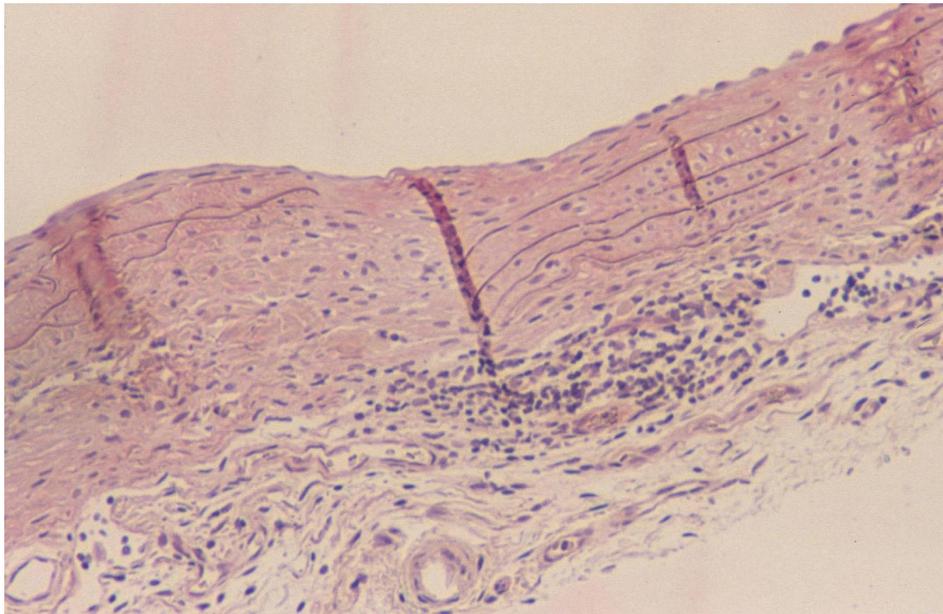
AB 7/6 C III

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Ein weiteres Beispiel für die Möglichkeit der Vermeidung solcher Schwächungen stellt die Abbildung 27 dar. Hier ist es zu einem gutem Langzeitergebnis ohne wesentliche medialen Nekrosebildungen gekommen, da hier eine partielle Apposition der Gefäßenden stattfand. Stauchungen sind in diesem Beispiel nicht aufgetreten.

ABB. 27: GUTES LANGZEITERGEBNIS BEI PARTIELLER APPOSITION DER GEFÄßENDEN BEI ANTI-KOLLAGEN -III FÄRBUNG



AB 7/7 C III

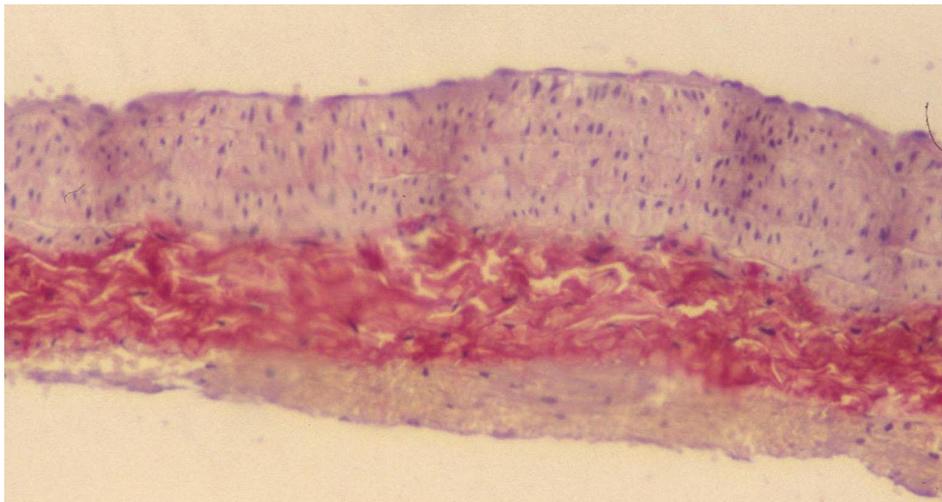
100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Kollagen IV

Typischerweise bekannt ist Kollagen IV als flächenbildendes Kollagen als Bestandteil der Basalmembran von Gefäßen. Es umschließt glatte Muskelzellen und Nervenzellen. In den von uns durchgeführten Färbungen findet sich neben einer oftmals nur dezent ausgeprägten Färbung der Basalmembran vor allem eine starke Färbung der Adventitia (Abbildung 28). Infolge der starken Adventitiemitreaktion muß bei unserem verwendeten Antikörper von einer möglicherweise vorhandenen Kreuzreaktivität mit Kollagen I ausgegangen werden. Kollagen I stellt zusammen mit Kollagen III 80-90% des Gefäßgesamtkollagengehaltes und findet sich vor allem innerhalb der Adventitia (STEBBENS 1995).

ABB. 28: KOLLAGEN -IV-VERTEILUNG AM NICHT OPERIERTEM GEFÄß



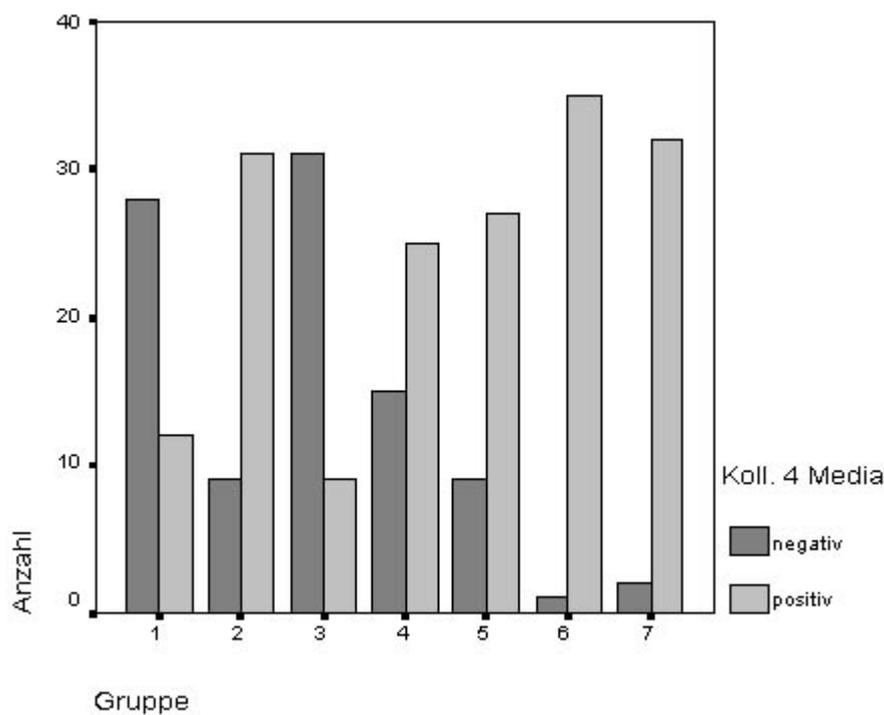
AB 1/5 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

In den beiden folgenden Diagrammen 10 und 11 haben wir die positiven Reaktionen im Bereich der Media und der Adventitia im Verlauf der Nachbeobachtungsintervalle dargestellt.

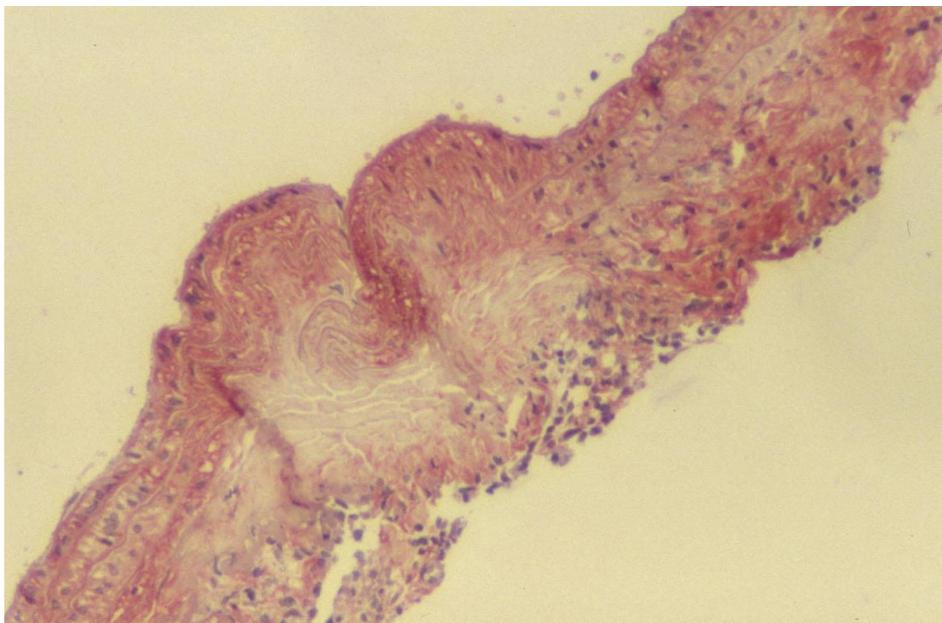
DIAGR. 10: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN ANTI-KOLLAGEN-IV-FÄRBUNG DER MEDIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Am unveränderten Gefäß ist die Media bei der anti-Kollagen-IV-Färbung nicht gefärbt, außer einer schwachen Reaktion im Bereich der Basalmembranen der Gefäßmuskelzellen

(Abbildung 28). Anders verhält es sich bei den operierten Gefäßen. Hier lassen sich in allen Nachbeobachtungsintervallen positive interstitielle Media-Färbungen darstellen. Insbesondere zu den späten Entnahmezeitpunkten sind in nahezu allen untersuchten Anastomosenbereichen (97% bei 28-Tage postoperativ, 94% bei 6 Monate postoperativ) gefärbte mediale Bereiche darzustellen. Die Abbildung 29 zeigt bei einem 3 Tage postoperativ entnommenen Gefäß eine positive mediale Färbereaktion bei einer negativen adventitiellen Kollagen-IV-Färbung im Anastomosenbereich.

A B B . 29: K O L L A G E N - I V - P O S I T I V E M E D I A B E I N E G A T I V E R A D V E N T I T I A I M A N A S T O M O S E N B E R E I C H 3 T A G E P O S T O P E R A T I V



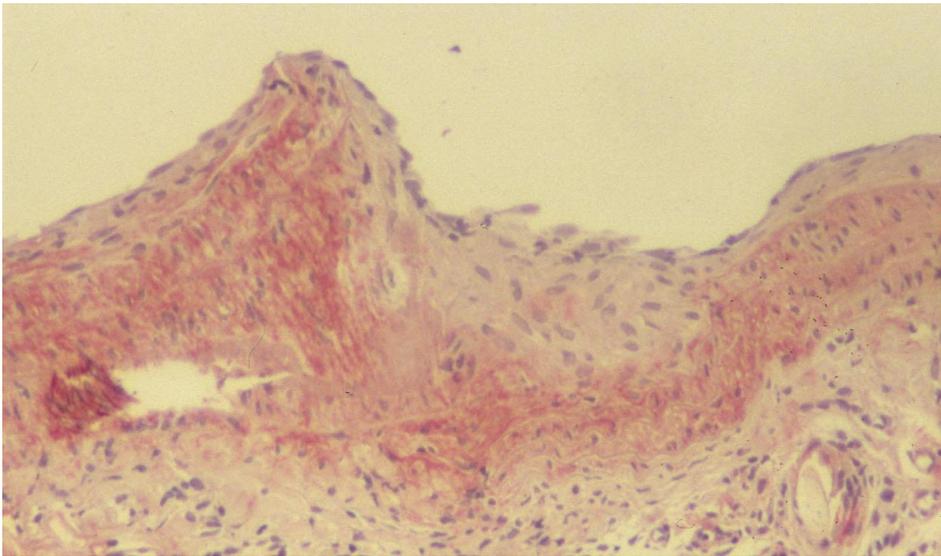
AB 4/8 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Die Abbildung 30 zeigt ebenfalls eine positive anti-Kollagen-IV-Färbung im Bereich der Media, sowie eine negative Färbereaktion im Bereich der Adventitia. Desweiteren läßt sich im lateralen Bildanteil, unterhalb der schwach ausgeprägten myointimalen Hyperplasie, eine saumförmige gefärbte Struktur als Basalmembran, beziehungsweise als Lamina elastica interna, verfolgen. Der Nachweis bricht jedoch im Bereich der Spitze ab und läßt sich im Bereich der Senke nicht mehr weiterführen.

ABB. 30: POSITIVE MEDIA BEI EINEM 28 TAGE POSTOPERATIV ENTNOMMENEN GEFÄß,
BASALMEMBRAN NICHT DURCHGÄNGIG ZU VERFOLGEN



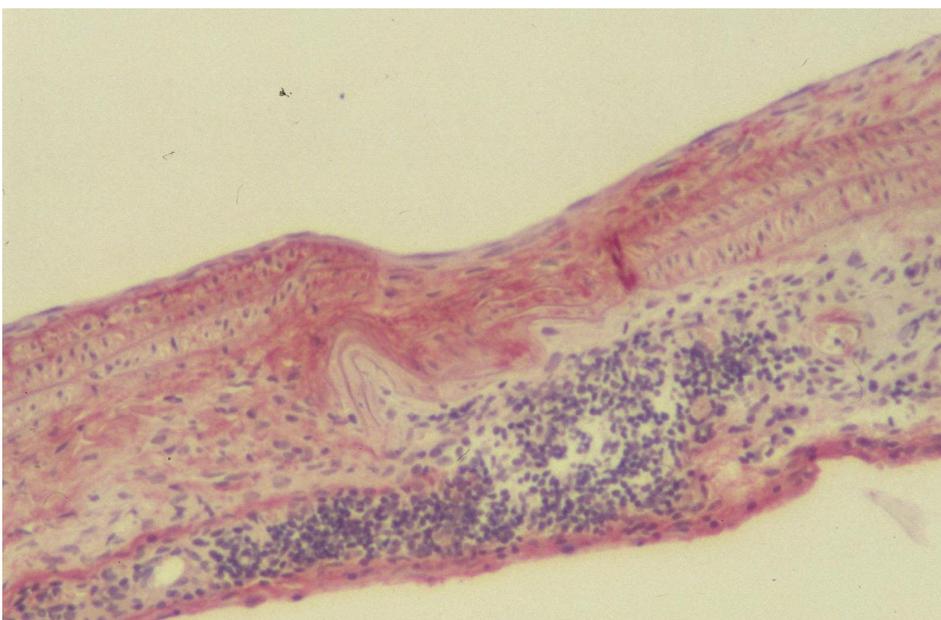
AB 6/8 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Als Beispiel für die gute Darstellbarkeit einer Basalmembran dient die Abbildung 31. Hierbei handelt es sich um eine Anastomose eines 6 Monate postoperativ entnommenen Gefäßes. Auch hier zeigt sich wieder die positive mediale und negative adventielle Färbereaktion. Vom lateralen linken Bildrand beginnend läßt sich hier die Lamina elastica interna als gefärbte saumförmige Struktur verfolgen.

ABB. 31: POSITIVE BASALMEMBRAN UND MEDIA IM ANASTOMOSENBEREICH EINES 6 MONATE
POSTOPERATIV ENTNOMMENEN GEFÄßES



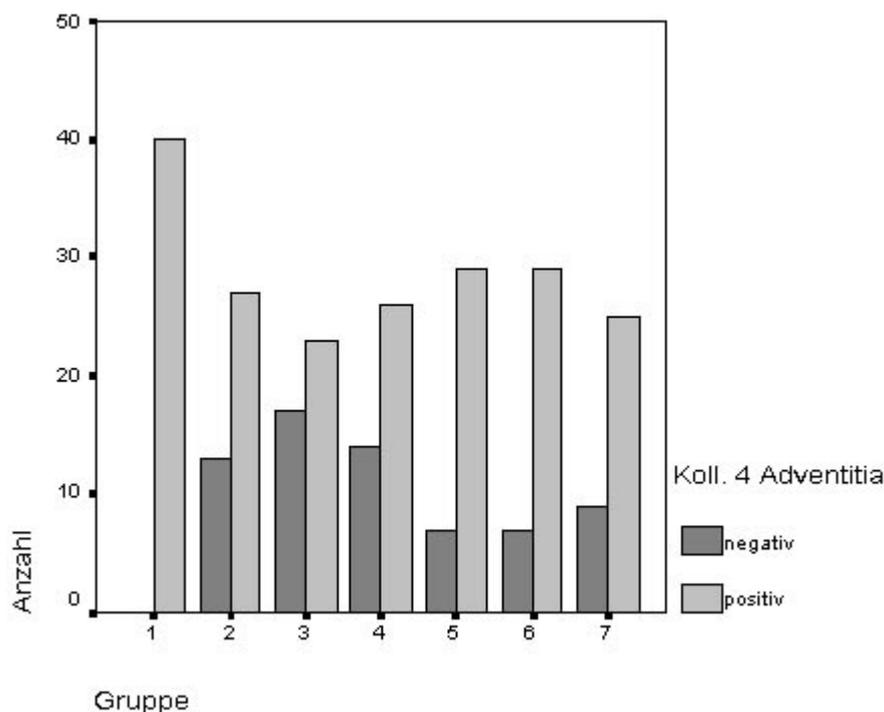
AB 7/8 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Im Diagramm 11 sind die positiven anti-Kollagen-IV-Färbungen im Bereich der Adventitia der zu beurteilenden Anastomosen im Verlauf der Nachbeobachtungsintervalle aufgeschlüsselt. Hierbei zeigt sich im mittleren Bereich eine Abnahme der adventitiellen Färbehäufigkeit. In Gruppe 3 (24 Stunden postoperative Gefäßentnahme) sind Färbungen im Bereich der Adventitia in 57,5% der untersuchten Fälle vorhanden. In den späteren Gruppen ist die Anzahl der positiven untersuchten Anastomosen höher (Gruppe 6, 28 Tage postoperativ Gefäßentnahme, 80,5%; Gruppe 7, 6 Monate postoperativ Gefäßentnahme, 73,5%), sie erreichen aber nicht den Anteil eines nicht operiertem Kontrollgefäßes oder den Anteil bei Gefäßentnahme direkt postoperativ (Gruppe1, Entnahme direkt postoperativ, 100% positive adventitielle Färbereaktionen).

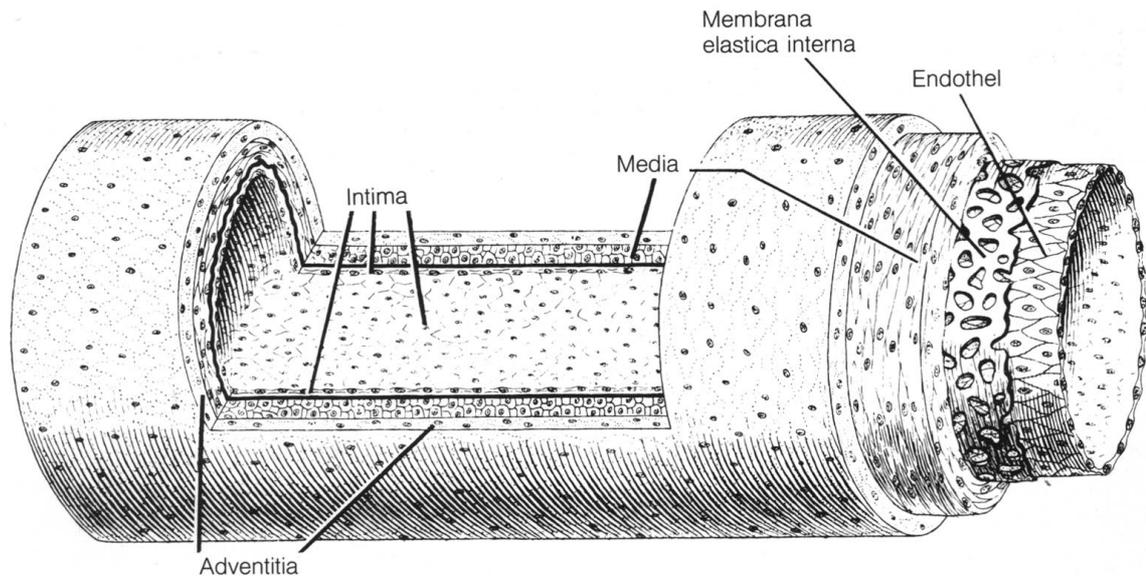
DIAGR. 11: BALKENDIAGRAMM ZUR BEURTEILUNG DER HÄUFIGKEIT DER POSITIVEN ANTI-KOLLAGEN-IV-FÄRBUNG DER ADVENTITIA IM ANASTOMOSENBEREICH IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN



Zusammenfassung Ergebnisse

In den Tabellen 7-14 sind die zum Teil bereits graphisch dargestellten Ergebnisse (Diagramme 1-11) nochmals umfassend in tabellarischer Anordnung aufgelistet. Die Abbildung 32 stellt den schematischen Gefäßwandaufbau dar.

ABB. 32: SCHEMATISCHER GEFÄßWANDAUFBAU



JUNQUEIRA & CARNEIRO 1991

Vorhanden sind für die anti-Von-Willebrand-Faktor-, anti-Laminin-, anti-Kollagen-III- und anti-Kollagen-IV-Antikörperfärbungen jeweils Tabellen für die Ergebnisse an den Anastomosen und an den Interponaten. Die Ergebnisse für die anti-Von-Willebrand-Faktor-Färbungen im Endothelbereich wurden bereits in Tabelle 6 wegen der gesteigerten Meßpunktdichte dargestellt, somit erfolgt hier nur die tabellarische Darstellung der Media- und Adventitiaergebnisse bei der anti-Von-Willebrand-Faktor-Färbung.

TAB. 7: FÄRBUNGEN IM ANASTOMOSENBEREICH BEIM ANTI-VON-WILLEBRAND-FAKTOR-ANTIKÖRPER, ERGEBNISSE IM ENDOTHELBEREICH SIEHE TABELLE 6

Anastomosen anti-Von-Willebrand-Faktor						
Gruppe	Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	40	0	0	40	21	52,5
2	40	0	0	40	36	90
3	38	0	0	38	34	89,4
4	36	0	0	36	32	89
5	38	0	0	38	19	50
6	32	0	0	32	0	0
7	36	0	0	36	0	0

TAB. 8: FÄRBUNGEN IM INTERPONATBEREICH BEIM ANTI-VON-WILLEBRAND-FAKTOR-ANTIKÖRPER, ERGEBNISSE IM ENDOTHELBEREICH SIEHE TABELLE 6

Interponat anti-Von-Willebrand-Faktor						
Gruppe	Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	20	0	0	20	9	45
2	20	0	0	20	0	0
3	20	0	0	20	3	15
4	20	0	0	20	2	10
5	20	0	0	20	2	10
6	18	0	0	18	0	0
7	18	0	0	18	0	0

TAB. 9: FÄRBUNGEN IM ANASTOMOSENBEREICH BEIM ANTI-LAMININ-ANTIKÖRPER

Anastomosen anti-Laminin									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	32	0	0	32	26	81	32	0	0
2	32	0	0	32	29	91	32	0	0
3	30	0	0	30	19	63	30	0	0
4	30	0	0	30	23	77	30	0	0
5	30	0	0	30	29	97	30	25	83,3
6	32	0	0	32	32	100	32	12	37,5
7	32	0	0	32	25	78	32	0	0

TAB. 10: FÄRBUNGEN IM INTERPONATBEREICH BEIM ANTI-LAMININ-ANTIKÖRPER

Interponat anti-Laminin									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	18	0	0	18	18	100	18	0	0
2	20	0	0	20	20	100	20	0	0
3	16	0	0	16	16	100	16	0	0
4	16	0	0	16	16	100	16	0	0
5	16	0	0	16	16	100	16	0	0
6	16	0	0	16	16	100	16	0	0
7	16	0	0	16	16	100	16	0	0

TAB. 11: FÄRBUNGEN IM ANASTOMOSENBEREICH BEIM ANTI-KOLLAGEN-III-ANTIKÖRPER

Anastomosen anti-Kollagen-III									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	40	0	0	40	35	87,5	40	0	0
2	28	0	0	28	19	68	28	0	0
3	40	0	0	40	25	62,5	40	0	0
4	38	0	0	38	26	68,4	38	0	0
5	36	0	0	36	25	69,4	36	0	0
6	34	0	0	34	29	85,3	34	0	0
7	34	0	0	34	20	58,8	34	0	0

TAB. 12: FÄRBUNGEN IM INTERPONATBEREICH BEIM ANTI-KOLLAGEN-III-ANTIKÖRPER

Interponat anti-Kollagen-III									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	20	0	0	20	20	100	20	0	0
2	16	0	0	16	16	100	16	0	0
3	20	0	0	20	20	100	20	0	0
4	20	0	0	20	20	100	20	0	0
5	20	0	0	20	20	100	20	2	10
6	20	0	0	20	20	100	20	0	0
7	18	0	0	18	18	100	18	0	0

TAB. 13: FÄRBUNGEN IM ANASTOMOSENBEREICH BEIM ANTI-KOLLAGEN-IV-ANTIKÖRPER

Anastomosen anti-Kollagen-IV									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	40	0	0	40	12	30	40	40	100
2	40	0	0	40	31	77,5	40	27	67,5
3	40	0	0	40	9	22,5	40	23	57,5
4	40	0	0	40	25	62,5	40	26	65
5	36	0	0	36	27	75	36	29	80,1
6	36	0	0	36	35	97,2	36	29	80,1
7	34	0	0	34	32	94	34	25	73,6

TAB. 14: FÄRBUNGEN IM INTERPONATBEREICH BEIM ANTI-KOLLAGEN-IV-ANTIKÖRPER

Interponat anti-Kollagen-IV									
Gruppe	Intima/ Endothel			Media			Adventitia		
	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %	N	pos. N	pos. %
1	20	0	0	20	6	30	20	20	100
2	20	0	0	20	19	95	20	19	95
3	20	0	0	20	20	100	20	20	100
4	20	0	0	20	20	100	20	20	100
5	20	0	0	20	20	100	20	14	70
6	18	0	0	18	18	100	18	18	100
7	18	0	0	18	12	66,7	18	18	100

Erklärung zu den Tabellen 6-13:

N: Gesamtzahl der untersuchten Anastomosen bzw. Interponate

Pos. N: Anzahl der positiven Färbungen im Kollektiv N

Pos. %: prozentualer Anteil der positiven Färbungen unter den untersuchten Färbungen

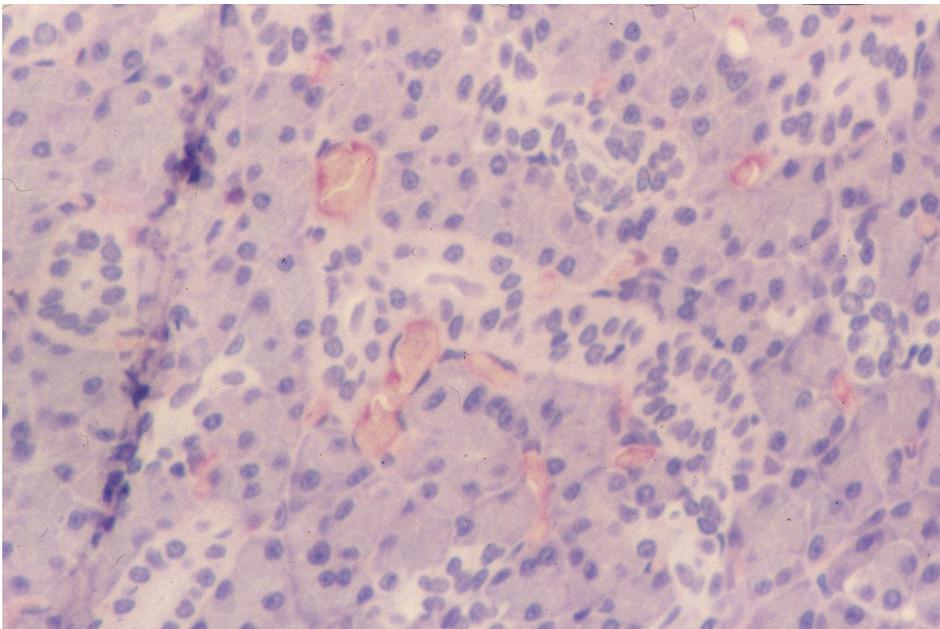
Kontrollen

Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurden Gewebeproben von Kontrollorganen mitgeführt.

Von-Willebrand-Faktor (vWF)

Die Abbildung 32 zeigt einen Anschnitt der Glandula mandibularis. Diese ist einem der operierten Tiere nach Perfusionsfixation entnommen worden. Hier zeigt sich ebenfalls eine positive Färbereaktion im Bereich der versorgenden Gefäßlumina. Es stellen sich Von-Willebrand-Faktor positive Endothelzellen innerhalb der Lumina dar. Die Reaktion entspricht den Erwartungen, da sowohl unverändertes Gefäßendothel im Bifurkationsbereich der untersuchten Gefäße, als auch die Vasa vasora der Gefäße positiv im Endothelbereich angefärbt wurden (Abbildung 10 und 16). Anderes Gewebe wurde in den von durchgeführten Kontrollen nicht angefärbt bei Verwendung des anti-vWF-Antikörpers aus Tabelle 4.

ABB. 32: VON-WILLEBRAND-FAKTOR POSITIVES ENDOTHEL IN DER GLANDULA MANDIBULARIS DER WISTAR-RATTE



AB 10/8 vWF

200-fach;

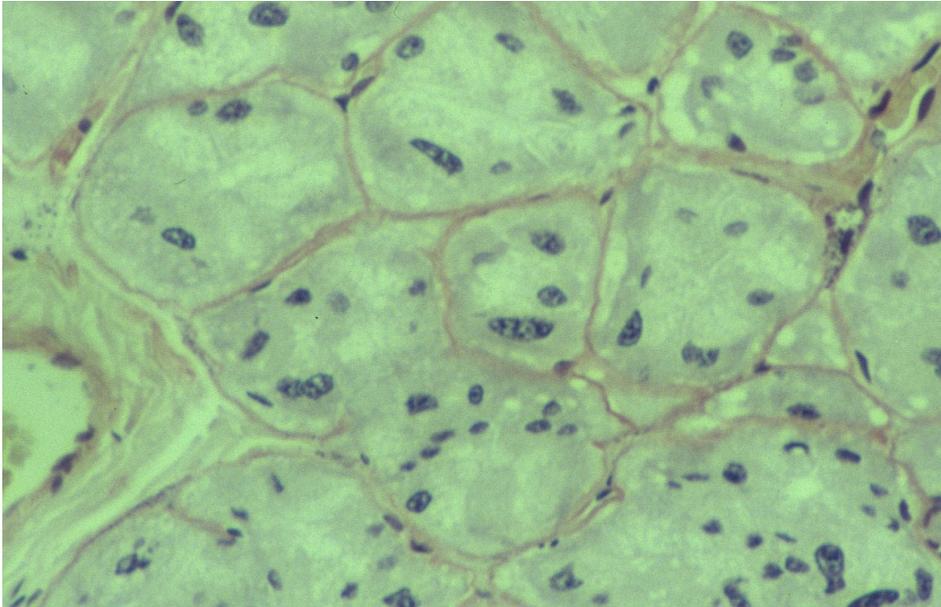
f=6,7; 1/30s

Laminin

Laminin findet sich wie Kollagen IV oft im Bereich von Basalmembranen. In der Abbildung 33 ist wie in Abbildung 32 ein Anschnitt der Glandula mandibularis. Hier findet sich eine ähnliche Färbung wie bei der Kollagen-IV-Kontrolle in der Speicheldrüse in Abbildung 37.

Anders als in Abbildung 32 sind hier vor allem die Basalmembranen der Drüsenausführungsgänge positiv angefärbt.

ABB. 33: LAMININ-POSITIVE BASALMEMBRANEN IN DER SPEICHELDRÜSE DER WISTAR-RATTE



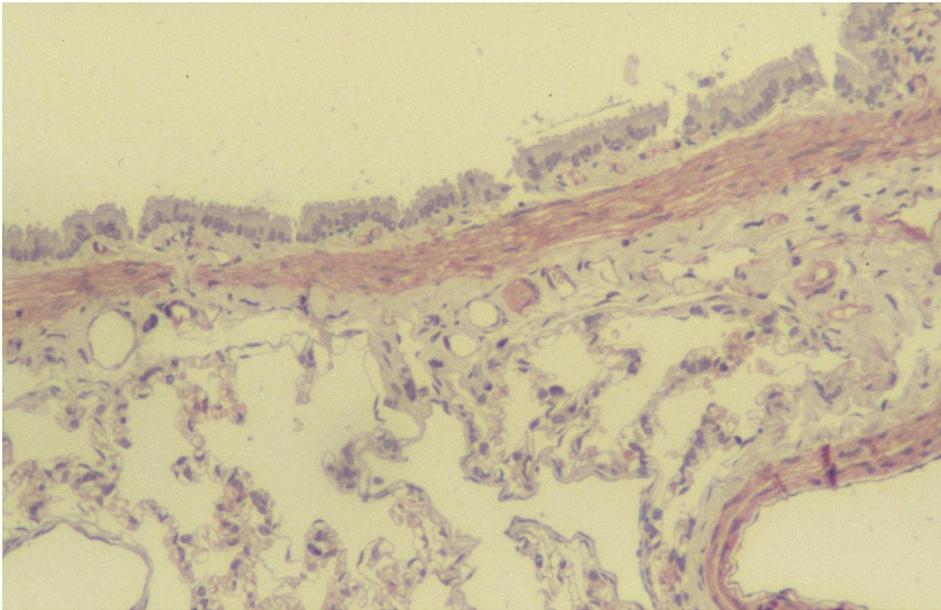
AB 10/8 Lam.

200-fach;

f=6,7; 1/30 s

Als weiteres Beispiel für Laminin-positives Gewebe dient die Abbildung 34. Hierbei handelt es sich um einen Anschnitt von Lungengewebe. Das große Lumen im oberen Bildanteil wird von respiratorischem Epithel begrenzt und stellt einen Bronchusanschnitt dar. Zentral im Bild zeigen sich Alveolenanschnitte. Eine Laminin-positiv gefärbte Bindegewebsfärbung zeigt sich im Bronchus umgrenzenden Bindegewebe. Hierbei handelt es sich um Basalmembranen unterhalb des Epithels und um angrenzendes Bindegewebe.

ABB. 34: LAMININ-POSITIVES BINDEGEWEBE IM INTERSTITIUM DER LUNGE



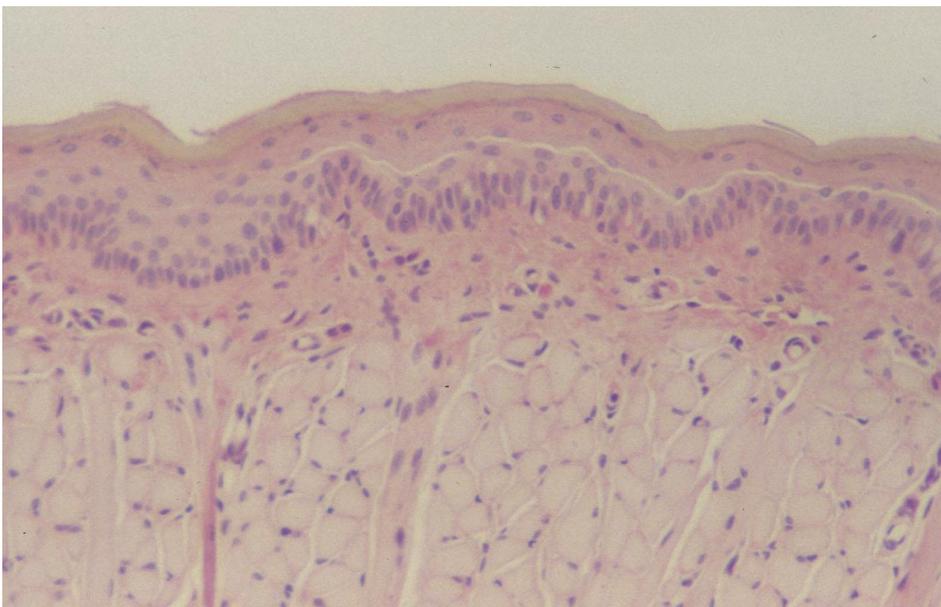
AB 9/5 Lam.

100-fach,
f=6,7; 1/30 s

Kollagen III

Kollagen III findet sich außer in Gefäßwänden in lymphatischen Organen, in der Leber, in der Milz, in der Niere, in der Lunge, in glatter Muskulatur und im Corium der Haut. In Abbildung 35 stellt sich schwach Kollagen-III-positives Bindegewebe im Bereich der Zungenoberfläche dar.

ABB. 35: SCHWACH ANTI-KOLLAGEN-III POSITIVES INTERSTITIELLES BINDEGEWEBE IM BEREICH DER ZUNGENOBERFLÄCHE



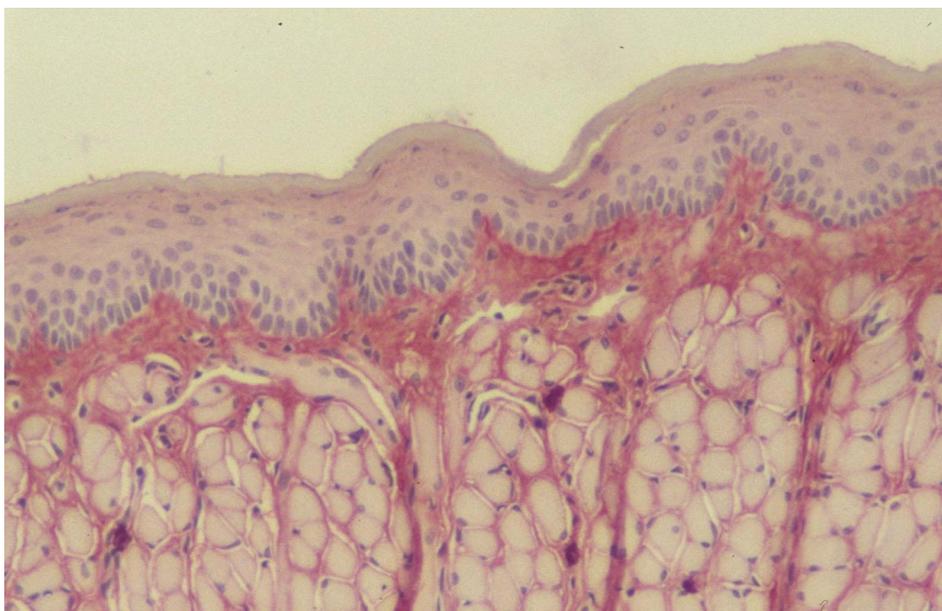
AB 9/6 CIII

100-fach;
f=6,7; 1/30 s

Kollagen IV

Bei dem von uns verwandten anti-Kollagen-IV-Antikörper handelt es sich um einen möglicherweise sich absolut spezifischen Antikörper für Kollagen IV. Dieser Rückschluß folgte bereits aus der starken adventitiellen Mitreaktion des unveränderten Gefäßpräparates in Abbildung 28. Die Abbildung 36 zeigt eine kräftig positive Reaktion im Bereich der Zungenoberfläche (vergleiche Abbildung 35). Die Bindegewebssepten, sowie perimuskuläre Bindegewebsfasern stellen sich im Präparat positiv dar. Im Bereich der Basalmembran unterhalb des Zungenepithels zeigt sich vor allem im mittleren Anteil des Bildes eine kräftig angefärbte Basalmembran.

ABB. 36: KOLLAGEN-IV-POSITIVES BINDEGEWEBE IM OBERFLÄCHLICHEN BEREICH DER ZUNGENMUSKULATUR DER WISTAR-RATTE



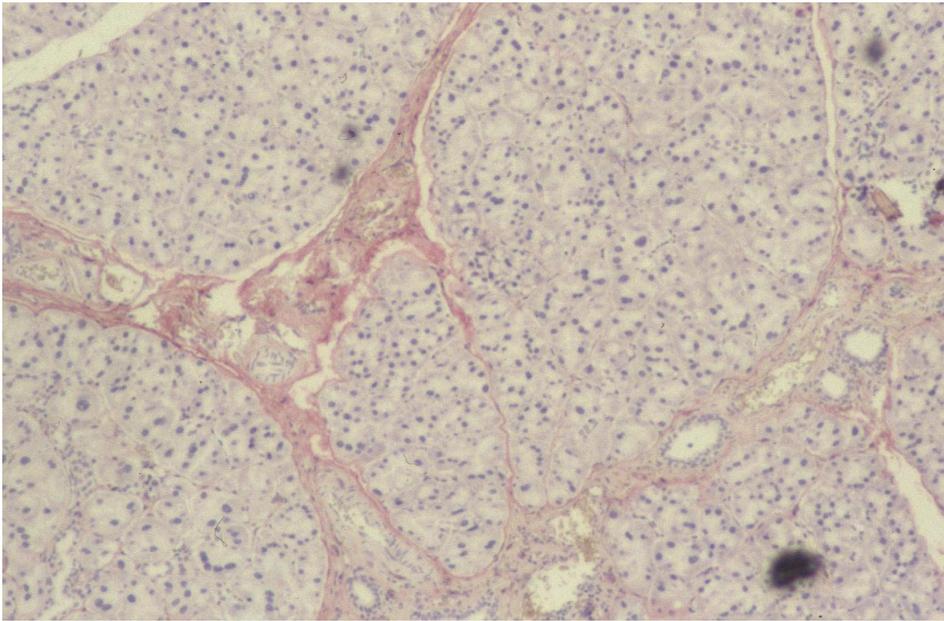
AB 9/6 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/30 s

Die Abbildung 37 zeigt einer ähnlichen Bildausschnitt wie die Abbildung 33 in etwas geringerer Vergrößerung. Auch hier zeigt das periglanduläre Bindegewebe eine positive Färbereaktion gegen den anti-Kollagen-IV-Antikörper. Anders als in dem Laminin-positiven Speicheldrüsenanschnitt aus Abbildung 33 färbt sich hier in Abbildung 37 jedoch weniger das unmittelbare periduktale Bindegewebe, sondern vor allem das interstitielle und Septen begrenzende Bindegewebe positiv. Eine relativ schwach anti-Kollagen-IV angefärbte unveränderte Speicheldrüse stellt keinen ungewöhnlichen Befund dar. Stärkere Anfärbungen wären zum Beispiel bei infolge von Strahlenschäden verbreiterten Basalmembranen zu erwarten (FRIEDRICH et al. 2000).

ABB. 37: KOLLAGEN-IV-POSITIVES BINDEGEWEBE IM DER SPEICHELDRÜSE DER WISTAR-RATTE



AB 10/8 C IV

100-fach;

f=6,7; 1/15 s

DISKUSSION

Während bei Gefäßverschlüssen in der akuten und perakuten postoperativen Phase zumeist eine Thrombose ursächlich ist (ACLAND 1972, OLSSON et al. 2000), so liegen bei Gefäßverschlüssen 6 Monate bis 3 Jahre nach der Gefäßoperation die Hauptursachen entweder in einer Progression einer distalen myointimalen Hyperplasie oder in proximal oder distal der Anastomose auftretenden Gefäßinsuffizienzen (IMPARATO et al. 1972 & 1974, TAMAKI et al. 1999). Mit den thrombotischen Komplikationen der frühen postoperativen Phasen haben sich bereits viele Autoren beschäftigt (ACLAND 1972 & 1977, ASHFORD 1967, AUER 1977). Im Rahmen dieser Diskussion beschäftigen wir uns in der funktionellen und morphologischen Diskussion mit der myointimalen Progression und in der Diskussion der Kollagene, vor allem des Kollagen III und des Laminin mit der Gefahr der Gefäßinsuffizienz. Bei der Diskussion der Ergebnisse des von-Willebrand-Faktors werden wir versuchen einen Beitrag bezüglich der Aufklärung der Endothelentstehung und Endothelwanderung zu leisten.

Funktionelle und morphologische Diskussion

Die myointimale Hyperplasie gilt als eine Proliferation von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten mit einer exzessiven Produktion von kollagenhaltiger Extrazellulärmatrix. Physiologischerweise tritt sie beim embryonalen Verschluß des Ductus arteriosus Botalli und bei der Involution des Uterus auf (NEWBY & ZALTSMAN 2000). Tamaki et al. konnten 1999 an arteriell implantierten autovenösen Bypässen zeigen, daß eine schlechte Durchflußrate eine Progression der myointimalen Hyperplasie fördert. Verglichen wurde eine Gruppe mit Normalfluß mit Gruppen mit reduziertem Fluß infolge einer distal des Interponates durchgeführten partiellen Gefäßkauterung. Beim Normalfluß konnte eine durchschnittlich 50µm dicke myointimale Hyperplasie festgestellt werden, bei Durchflußreduktion erhöhte sich dieser Wert auf 290µm. Oberhalb von 250µm konnten sogar in der unteren Lage der myointimalen Hyperplasie diese versorgende Vasa vasorum nachgewiesen werden (TAMAKI et al. 1999). Zu ähnlichen Beobachtungen gelang bereits 1893 Dr. Alexis Sokoloff, indem er eine bindegewebige Intimaverdickung bei verlangsamtem Blutdurchfluß beschrieb. Er erreichte diese in seinen Versuchen durch partiell doppelt unterbundene Gefäße (SOKOLOFF 1893). Eine über die Zeitintervalle deutliche Rückentwicklung der myointimalen Hyperplasie konnte in unseren

Nachbeobachtungsintervallen nicht nachgewiesen werden. Exzessive Steigerungen konnten zwar auch nicht nachgewiesen werden, aber trotzdem liegt der Schluß nahe, daß die Gefahr geringer ist, wenn die Gefäßapposition eine hohe Durchflußrate zuläßt. Insofern sind Stauchungen, Versatzbildungen und Inversionen ungünstige Appositionsformen, da diese einen Flußwiderstand darstellen. Bei den Gefäßappositionen zeigte sich ein hoher Anteil an Stauchungen und Versatzbildungen. In 79,5% aller untersuchten Gefäßanastomosen fanden sich Versatzbildungen und Stauchungen (Tabelle 5). Bedeutsam ist, daß es trotz dieses hohen Anteils an negativen Appositionsformen nur bei einem 28 Tage postoperativ entnommenen Gefäß zu einem Gefäßverschluß kam. Somit stellt die histologische Beurteilung der Gefäßapposition eine sehr exakte Beurteilung für eine prognostische Aussage dar. Die ideale Form der Stoßapposition, hierbei entsteht histologisch das geringste Trauma, kommt sehr selten vor (nur in 2,2% der beurteilten Fälle). Eine partielle Stoßapposition ist zwar häufiger, aber trotzdem nur in jedem 10. Fall zu sehen. Ergebnisse, die belegen, daß eine Transplantation eines arteriellen Segmentes ohne Verletzung der Intima möglich sind (NEIL et al. 2000), konnten wir nicht nachvollziehen. In Anbetracht unserer Ergebnisse ist, auch unter Berücksichtigung des langfristigen postoperativen Verlaufes, eine korrekte Apposition der Gefäßenden sehr wichtig und man kann sich den Forderungen anderer Autoren nur anschließen (BAXTER et al. 1972, FRIEDRICH et al. 1998 & 2000, HÖLTJE & SCHWIPPER 1983, MINDERJAHN & DAHM 1980, O'BRIEN 1977).

Von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF) dient dem Nachweis von differenzierten Endothelzellen. Er ist dem Vorkommen und den Nachweisqualitäten vergleichbar mit dem Endothelin-1, Synonym: CD-31. Außer in differenzierten Endothelzellen, die den Von-Willebrand-Faktor synthetisieren, findet sich der Von-Willebrand-Faktor auch als großes Plasmaprotein. Sofort nach der Gefäßwiedereröffnung war der vWF noch positiv nachzuweisen im Intimabereich der untersuchten Präparaten zu 62,5% bis 94,4%, durchschnittlich 78,8%, an den Anastomosen und zu 75% bis 90%, durchschnittlich 86,7%, im Interponatbereich. Acht Stunden postoperativ sind an den neun untersuchten Punkten pro Gefäßseite im Durchschnitt nur noch 27,8% der Gefäße positiv. Nach 24 Stunden sind im engeren Anastomosenbereich keine Von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße mehr nachzuweisen. Im Interponatbereich ist nur noch in durchschnittlich 8,6% der untersuchten Präparate ein positiver Nachweis zu führen. Thurston beschreibt 1976 bei der Nachuntersuchung von Gefäßklemmschäden, daß

nach 4 Stunden das Endothel nahezu untergegangen sei (THURSTON et al. 1976). Zwei weitere Fragen schließen sich jetzt an:

Wann kommt es zu einer Endothelregeneration?

Die hierfür vorhandenen Angaben in der Literatur variieren stark, zudem wird ein licht- oder elektronenmikroskopisch erhobener Befund oftmals mit dem Anspruch einer Funktionsfähigkeit gleichgesetzt. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, daß die Funktionsfähigkeit des Endothels im Interponatbereich nach 8 Tagen in durchschnittlich 61,7% der Fälle wieder vorhanden ist. Nach 28 Tagen sind im Mittel 92,7% der untersuchten Interponate vWF-positiv. Im Anastomosenbereich sind nach einer Woche bereits wieder im Mittel 83,7% der untersuchten Anastomosen vWF-positiv, nach 28 Tagen sind es 95,7% durchschnittlich, und nach 6 Monaten sind 98,8% der untersuchten Gefäße im Anastomosenbereich vWF-positiv. An den Ergebnissen zeigt sich, daß die Regeneration im Anastomosenbereich zeitlich vor der Regeneration im Interponatbereich abläuft. Trotzdem ist eine exakte Angabe über die Regenerationszeit nicht möglich, da die Regenerationszeit zum Beispiel auch abhängig ist von der Schwere des lokalen Defektes. Minderjahn beschreibt ebenfalls, daß die Reparationsvorgänge nach Gefäßläsion von dem Verletzungsmodus, dem Ort der Verletzung und der Spezies abhängig sind, und daß in der Folge die Reendothelialisierungsgeschwindigkeit von vielen Autoren unterschiedlich beurteilt wird (MINDERJAHN 1983).

Woher kommt die Endothelregeneration?

Vier Möglichkeiten sind denkbar:

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

Hierbei sind ebenfalls Kombinationen aus 1. bis 4. möglich. Woher die Endothelregeneration letztendlich kommt, können wir mit unserem Versuchsansatz nicht definitiv klären. Aus einem fortlaufenden Prozeß der Regeneration liegen uns nur einzelne Momentaufnahmen vor. Die Summation aller momentanen Aufnahmen wird graphisch im Diagramm 4 dargestellt. Gezeigt wird dort die Häufigkeit eines Von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäßnachweises in Abhängigkeit vom Gefäßverlauf und dem Zeitpunkt der Gefäßentnahme. Im interessanten Bereich des 8-Tage-postoperativen Balkens ist die Regeneration im Randbereich des Interponates und an den Anastomosen weiter fortgeschritten als im Zentrum des Interponates.

Dieser Befund unterstützt zum einen die These eines Einwachsens von Endothel aus den Randbereichen ins Zentrum, zum anderen widerlegt dieser Befund auch nicht die Möglichkeit, daß das neue Endothel sich aus undifferenzierten Progenitorzellen neu bilden kann. Es kann also keine der oben genannten vier Möglichkeiten ausgeschlossen werden, wobei aufgrund des früher positiven Nachweises in den Randbereichen eine gerichtete Endothelneubildung wohl zumindest in der Kombination einen Anteil übernimmt. Über den Ablauf der zugrundeliegenden Mechanismen kann diese Arbeit keine Aussage treffen, trotzdem wollen wir im folgenden aktuelle Forschungserkenntnisse kurz darstellen und in bezug auf unser Problem diskutieren. Es wird bei Gefäßneubildungen oder Regenerationen von Gefäßen sowohl zu einer Proliferation als auch zu einer Migration von Endothelzellen kommen (AUSPRUNK et al. 1991). Auch kann davon ausgegangen werden, daß die organspezifischen Eigenschaften entstehen über Interaktionen mit dem Organ selber oder über dessen Matrix (AUERBACH et al. 1991). Für eine myointimale Herkunft könnte sprechen, daß die Endothelialisierung im Bereich der Randbereiche der Interponate schneller voranschreitet als im Interponatzentrum. Oft wurden myointimale Hyperplasien beobachtet, die nur in der obersten Lage differenzierte Endothelzellen haben (Abbildungen 13 und 14). Viele Autoren schlagen vor, daß das Neoendothel aus proliferierenden, unbeschädigten benachbarten Endothelzellen entsteht (THURSTON et al. 1976, MINDERJAHN 1983). Zeitgleich und teilweise bevor sich Endothelzellen luminal nachweisen lassen, gibt es starke Nachweise von Endothelzellen im adventitiellen Bereich der Anastomosen. Diese adventitiell nachweisbaren Endothelzellen könnten sich zum Teil an der Bildung neuer Vasa vasora beteiligen. Ein Teil von ihnen könnte aber auch über Migration im lateralen Bereich der Anastomose den luminalen Bereich erreicht. Dort könnte es dann unter den modulierenden Einflüssen der extrazellulären Matrixproteine zu einer endgültigen, organspezifischen Spezifizierung kommen. Eine unterstützende Darstellung auf molekularer Ebene wird von Vestweber (2000) gegeben. Er untersuchte das Zusammenspiel der Endothelzellen, ihrer Kontakte zueinander und ihre Steuerung im Rahmen der Angiogenese. Es handelt sich hierbei um ein komplexes Zusammenspiel zwischen Membranproteinen, zytoskeletalen Komponenten und assoziierten Signalmolekülen. Bei der Ausbildung neuer Gefäße könnte es bei vorexistierenden Endothelzellen zu einem Verlust aller Zellkontakte und zu einer Migration derselben kommen. Die Funktionen der Zellkontakte würden hierbei von zahllosen Komponenten der extrazellulären Matrix übernommen. Diese Mechanismen verlaufen über Integrine. Das sind heterodimere transmembrane Proteine, die aus einer Gruppe von 15 verschiedenen α - und 8 verschiedenen β -Untereinheiten bestehen (WITTE & BARBUL

1997). Mehr als 20 Kombinationen sind bereits bekannt, wichtige Rollen übernimmt zum Beispiel das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_5$. Bei den Signalproteinen zur Endothelzellwanderung gilt aktuell VE-Cadherin als eines der wichtigsten Proteine. VE-Cadherin ist notwendig für die Organisation von Gefäßähnlichen Strukturen und ohne VE-Cadherin kommt es zu einer Apoptose der Endothelzellen (VESTWEBER 2000). Eine parallel stattfindende Regeneration aus ortsständigen, peripheren Endothelzellen wäre bei kleineren Läsionen oder bei isolierten Anastomosen ebenfalls denkbar. Ob diese Vorgänge sich wirklich so abspielen oder nicht, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht beurteilt werden und sie sind somit rein spekulativ. Das definitive Ergebnis dieser Arbeit in diesem Teilbereich wurde oben anhand der Ergebnisse des Diagramm 4 diskutiert.

Laminin

Laminin ist als großes, nicht-kollagenes Glykoprotein einer der Hauptbestandteile von Basalmembranen. Man unterscheidet beim Laminin eine größere Anzahl von unterschiedlichen Isoformen, deren Synthesen geregelt verlaufen, über deren biologische Funktionen bisher jedoch Unklarheiten bestehen (STEBBENS 1995). Der von uns verwendete Antikörper weist im wesentlichen Laminin Typ I nach. Für den Nachweis und die Verteilung von Laminin im Gefäß sind die Anastomosenanposition und die Organisation der Gefäßwunde wichtig (FRIEDIRCH et al. 1998). Falls es im Wundheilungsverlauf bei insbesondere Stauchungen und Versatzbildungen zu Nekrosebildungen im Bereich der Media kommt, gibt es dort keine Restitutio ad integrum und es kommt zu einer minderwertigen Ersatzgewebsbildung mit einer erhöhten langfristigen Komplikationsrate, siehe auch Abbildungen 20 und 21. Bei den von uns durchgeführten immunhistochemischen Langzeitnachuntersuchungen zeigte sich nach 6 Monaten nur in 78% der untersuchten Fälle eine Laminin-positive Media im Anastomosenbereich, in 22% der Fälle waren Defektheilungen vorhanden, die zu einem Lamininverlust führten. Innerhalb der Adventitia im Anastomosenbereich ließen sich in der 5. und 6. Gruppe (Gefäßentnahme 8 Tage und 28 Tage postoperativ) Färbungen nachweisen. Dieses könnte erklärt werden über Laminin-positive neu entstehende Vasa vasorum im Bereich der Adventitiamanschette (FRIEDRICH 1998). Ein weiterer Erklärungsversuch besagt, daß die breite, Laminin-positive Adventitiamanschette die instabile Media, infolge fehlendem Laminin-haltigen und kollagenen Stützgewebe, vor Gefäßinsuffizienzen schützen soll (FRIEDRICH 2000). Jedoch sind in der Langzeitgruppe bei der Gefäßentnahme nach 6 Monaten keine Laminin-positiven

Reaktionen im Bereich der Adventitia aufgefallen. Laminin könnte in der mittleren Phase der Wundheilung im Bereich der Adventitia nicht oder nicht nur eine strukturelle Aufgabe haben, sondern ebenfalls für eine modulatorische Funktion im Bereich der Wundheilung wichtig sein.

Kollagen III

Das Kollagen III ist als fibrilläres Kollagen in hohem Maße für Wahrung der Organstruktur und für die Stabilität des Gefäßes verantwortlich (STEBBENS 1995, CORNELISSEN et al. 2000). Bekannte Störungen, bei denen es infolge eines Kollagen III-Mangels zu Verlust der Organstabilität kommt, sind zum Beispiel zerebrale Aneurysmen oder das Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV. Im Bereich der Gefäßwände von cerebralen Aneurysmen sind verminderte Kollagen-III-Vorkommen nachgewiesen worden. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen an denen im Rahmen von Autopsien entnommenen aneurysmatischen Gefäßen vor allem in abluminalen Schichten eine schwächere und diffusere Färbung als im Bereich der Media und Adventitia von Kontrollarterien (MIMATA et al. 1997). Das Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV entsteht durch Mutationen im Gen für Kollagen III. Die typischen Befunde bei diesen Patienten sind eine Hyperelastizität der Haut mit Neigung zu einer leichten Verletzbarkeit und Hämatombildung und eine Überstreckbarkeit der Gelenke. Charakteristisch bei diesen Patienten sind atrophe, bzw. hypertrophe ungewöhnlich häufige Narbenbildungen im Bereich verletzungsgefährdeter Körperareale (Stirn, Knie, Schienbein) (BRINKMANN et al. 1996). Der Typ IV ist bekannt für extrem fragile Blutgefäße und wird auch der arterielle Typ des Ehlers-Danlos-Syndroms genannt (STEBBENS 1995). In unserem Kollektiv ist auffällig, daß bei der Gefäßentnahme 6 Monate nach der Operation der Gehalt an Kollagen-III-positiver Media auf 58,8% abgefallen ist. Direkt nach der Operation waren in Gruppe 1 Kollagen-III-positiver Befunde in 87,5% der Fälle beobachtet worden. Insbesondere bei Betrachtung der Einzelfälle fällt auf, daß es bei ungünstigen Appositionsformen der Gefäßenden zu Nekrosebildungen im Bereich der Media kommt und das diese Nekrosen im Verlauf nur durch ein minderwertiges Ersatzgewebe aufgefüllt werden. Hierbei entsteht nicht das von den Mediamyozten synthetisierte Kollagen-III-haltige extrazelluläre Gewebe. In Analogie zu den oben erwähnten schweren Krankheitsbilder mit bekanntem Kollagen-III-Schaden zeigt sich die Wichtigkeit eines intakten Kollagen-III-Gehaltes für die mechanische Stabilität des Gefäßes. Die im Langzeitverlauf beobachtete Abnahme des Kollagen-III-Gehaltes in unserem Kollektiv geht

somit langfristig mit einem erhöhten Risiko an Gefäßinsuffizienzen und Gefäßaussackungen einher. Da diese Abnahme vor allem bei minderwertigen Gefäßappositionen auftritt, muß hier ebenfalls eine exakte technische Durchführung für die Prognose im Langzeitverlauf gefordert werden.

Kollagen IV

Auch wenn bei dieser Arbeit, insbesondere bei der Diskussion des Kollagen III stark die architektonische Komponente im Vordergrund steht, so spielen die Kollagene als Bestandteile der Extrazellulärmatrix eine große Rolle in der Modulation der Zellproliferation, der Differenzierung, der Zellwanderung, des Zellwachstums und der Proteinsynthese (AUSPRUNK et al. 1991, SAKATA et al. 1990, WITTE & BARBUL 1997). Daß es im Rahmen der Wundheilung zu einer veränderten Syntheseleistung kommt, haben andere Autoren bereits nachgewiesen (WITTE & BARBUL 1997). Im Rahmen unserer Untersuchungen stellen wir eine Mehrexpression in den späteren Phasen in der Media, sowie eine Abnahme der Syntheseleistung im Bereich der Adventitia fest. Das Ausmaß der Mehranreicherung ist abhängig vom eingetretenen Operationstrauma. Selbst die anatomisch korrekteste Gefäßapposition zieht eine geringe Traumatisierung nach sich. Etwas neu entstandenes, physiologisch falsch lokalisiertes Kollagen IV ist die Folge. Es besteht eine Abhängigkeit im Langzeitverlauf zwischen der Intensität des Kollagen-IV-Nachweises im Anastomosenbereich und den verschiedenen Appositionsformen. Je atraumatischer operiert werden kann, desto geringer fällt die mediale Kollagen-IV-Mehrexpression aus. In Anbetracht des ähnlichen Verteilungsmusters des Laminin und des Kollagen IV (FRIEDRICH et al. 1998, FRIEDRICH 2000), treffen die für Laminin festgestellten Aussagen auch auf Kollagen IV zu. Die Mediamitreaktion beim Kollagen IV ist in ihrem Ausmaß abhängig von der Appositionsform der Gefäße. Unproblematische, gute Appositionsformen führen zu geringeren Veränderungen im Bereich der extrazellulären Matrix.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung:

Im Gebiet der mit Gefäßanschluß verpflanzten Transplantate stellt die mikrochirurgische Gefäßanastomose das entscheidende Nadelöhr über Erfolg und Mißerfolg des Eingriffes dar. Im Rahmen einer tierexperimentellen Langzeituntersuchung wurde der Ablauf der Wundheilung in Gefäßinterponaten funktionell morphologisch und immunhistochemisch für vier repräsentative Bestandteile der Gefäßwand untersucht. Als repräsentative Bestandteile wurden das Kollagen III als Protein der Extrazellulärmatrix, der Von-Willebrand-Faktor als Endothelfaktor, das Kollagen IV und Laminin als Basalmembran assoziierte Proteine ausgewählt.

Material und Methode:

Bei 70 Wistar-Ratten, aufgeteilt in 7 Gruppen mit je 10 Tieren, wurde ein ungefähr 4 mm langer Abschnitt der A. carotis communis rechts entnommen. Nach Drehung um 180° erfolgte die beidseitige erneute Interponation. Nach einem gruppendifinierten Zeitintervall zwischen sofort nach der Reperfusion bis 6 Monate postoperativ erfolgte die Entnahme der A. carotis communis mit Bifurkation nach Kardioperfusion. Die formalinfixierten, paraffineingebetteten Blöcke wurden aufgeschnitten. Pro Längsschnittebene durch das entnommene Gefäß stellen sich neben dem Interponat und der Bifurkation vier Anschnitte von Anastomosen dar. Neben konventionellen Färbungen aus jedem Zeitabschnitt (HE, Elastica-van-Gieson) erfolgten die immunhistochemischen Färbungen (LSAB-2-Kit, DAKO, Hamburg).

Ergebnisse:

Die Auswertung erfolgte nach histomorphologischen Kriterien der einzelnen Anschnitte und nach Intensität der Antikörperfärbungen im Anastomosen- und Interponatbereich. Die Qualität der Stumpfapposition spiegelte sich in den positiven Färbehäufigkeiten wieder. Bei Beurteilung der Langzeitpräparate, insbesondere bei nicht idealer Gefäßapposition, lassen sich verminderte und veränderte Gefäßbestandteile nachweisen.

Diskussion:

Die technisch saubere Durchführung der mikrochirurgischen Gefäßanastomose ist nicht nur für den akuten und perakuten postoperativen Bereich klinisch wichtig, sondern muß auch unter Betrachtung eines langfristigen postoperativen Intervalls gefordert werden. Es konnte gezeigt werden, das die Reendothelialisierung an den Anastomosen und in den Randbereichen der Interponate eher vorhanden ist als im Zentrum der Interponate.

LITERATURVERZEICHNIS

Abbott WM, Callow A, Moore W (1993)

Evaluation and performance standards for arterial prostheses.

J Vasc Surg 17: 746-756

Acland R (1972)

Signs of patency in small vessel anastomosis.

Surgery 72: 744-748

Acland R (1977)

Prevention of thrombosis in microvascular surgery by the use of magnesium sulphate.

Brit J Plast Surg 25: 292-299

Acland RD, Trachtenberg L (1977)

The histopathology of small arteries following experimental microvascular anastomosis.

Plast Reconstr Surg 60: 868-875

Allbritton JI, Nousari HC, Anhalt GJ (1997)

Anti-epiligrin (laminin 5) cicatricial pemphigoid.

Br J Dermatol 137(6): 992-6

Auer L, Gratzl O, Waltinger P, Sixl G, Tritthart H (1977)

Endothelial changes after vascular surgery: a scanning electron microscopy study. In:

Schmiedek P (ed) „Microsurgery for Stroke“. Springer-Verlag, New-York-Heidelberg-Berlin, p 119-122

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

Ausprunk DH, Dethlefsen SM, Higgins (1991)

Distribution of fibronectin, laminin and type IV collagen during development of blood vessels in the chick chorioallantoic membrane.

In: RN Feinberg, GK Sherer, R Auerbach (eds): „The Development of the Vascular System.“
Issues Biomed, Vol 14, Karger, Basel, p 93-108

Austin GT, Hammon FW, Schoenberg SJ, Scharpf HO (1983)

A laboratory model for vascular microsurgery

J Oral Maxillofac Surg 41: 450-455

Bargmann W (1977)

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 7. Auflage, Thieme, Stuttgart

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

The histopathology of small vessels following microvascular repair.

Brit J Surg 59: 617-622

Biemer E, Duspiva W (1980)

Rekonstruktive Mikrogefäßchirurgie

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Bootz F, Müller GH (1992)

Mikrovaskuläre Gewebetransplantationen im Kopf-Hals-Bereich.

Thieme, Stuttgart, S 94

Brinkmann J, Behrens P, Brenner R, Bätge B, Tronnier M, Wolff HH (1999)

Ehlers-Danlos-Syndrom.

Hautarzt 50: 257-265

Cobbett JR (1967)

Small vessel anastomoses

Brit J Plast Surg 20: 16-20

Cornelissen AMH, Stoop R, Von den Hoff HW, Jaap CM, Kuijpers-Jagtman AM (2000)
Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat.
J Oral Pathol Med 29: 1-7

Daniel RK, Taylor GI (1975)
Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses
Plast Reconstr Surg 55: 177

Dürselen R (1988)
Langzeitstudie über laserassistierte Mikrogefäßanastomosen der Arteria carotis communis der Ratte mit dem modifizierten 1,319 Mikrometer Neodymium-YAG Laser.
Med Diss, Düsseldorf, S 1-43

Foucher G, Schuind F (1984)
A new trick for end-to-end anastomosis in microvascular surgery.
J Reconstr Microsurg 1: 49

Friedrich RE (1998)
Patency of experimental microvascular autografts of the common carotid artery following balloon dilatation: a technical note and first results.
Br J Oral Maxillo-Fac Surg 36: 365-370

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Plambeck K, Schmelzle R (1998)
Nachweis von extrazellulärem Matrixprotein (Laminin) in experimentellen Anastomosen.
Mund Kiefer GesichtsChir 2: 118-121

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Plambeck K (2000)
Zum Nachweis von Kollagenen in experimentellen arteriellen Anastomosen
Gefäßchirurgie 5: 33-37

Friedrich RE (2000)
Experimentelle Mikrochirurgie an vorgeschädigten Arterien.
Med Habil, Quintessenz, Berlin

Fujino T, Aoyagi F (1975)

A method of successive interrupted suturing in microvascular anastomoses.

Plast Reconstr Surg 55: 240-241

Furlan M (1996)

Von Willebrand factor: molecular size and functional activity.

Ann Hematol 72: 341-348

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

Gonzalez EE, Nathan P (1963)

A new method for anastomosing blood vessels by manually applied clips.

Angiology 14: 178-181

Greenwald SE, Berry CL (2000)

Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties.

J Pathol 190: 292-299

Harii KK, Ohmori J, Torii J (1976 a)

Free gracilis muscle transplantation with neurovascular anastomoses for the treatment of facialis paralysis.

Plast Reconstr Surg 57: 113

Harii KK, Ohmori J, Sekiguchi J (1976 b)

The free musculocutaneous flap.

Plast Reconstr Surg 57: 294

Harii KK, Ebihara S, Ono I, Saito H, Terui S, Takato T (1985)

Pharyngoesophageal reconstruction using a forearm free flap.

Plast Reconstr Surg 75: 463

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

Höltje WJ, Schwipper V (1983)

Vermeidbare und unvermeidbare Gefäßwandläsionen in der mikrochirurgischen Anastomose.

In: G Pfeifer, N Schwenzer (Hrsg): „Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie“, Band XXVIII, Thieme, Stuttgart, S 135-137

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981)

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.

J Histochem Cytochem 29: 577

Imparato AI, Bracco A, Kim GE, Zeff R (1972)

Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions.

Surgery 72: 1007-1017

Imparato AI, Baumann FG, Pearson J, Kim GE, Davidson T, Ibrahim I (1974)

Electron microscopic studies of experimentally produced fibromuscular arterial lesions.

Surg Gynecol Obstet 139: 497-504

Junqueira LC, Carneiro J (1991)

Histologie

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

Kirkpatrick P, D'Ardenne AJ (1984)

Effects of fixation and enzymatic digestion on the immunohistochemical demonstration of laminin and fibronectin in paraffin embedded tissue.

J Clin Pathol 37: 639

Krag C, Holck S (1981)

The value of the patency test in microvascular anastomosis: correlation between observed patency and size of intraluminal thrombus: an experimental study in rats.

Brit J Plast Surg 34, 64-66

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

Mimata C, Kitaoka M, Nagahiro S, Iyama K, Hori H, Yoshioka H, Ushio Y (1997)

Differential distribution and expressions of collagens in the cerebral aneurysmal wall.

Acta Neuropathol 94: 197-206

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 Schwenger (Hrsg): „Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie“, Band XXVIII, Thieme, Stuttgart, S 137-139

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, Dahm HH (1980)

Die Mikrogefäßnaht im Tierexperiment- ultrastrukturelle Untersuchungen zur Endothelregeneration.

Dtsch zahnärztl Z 35: 70-73

Mitchell GM, McCann JJ, Rogers IW, Hickey MJ, Morrison WA, O'Brien B McC (1996)

A morphological study of the long-term repair process in experimentally stretched but unruptured arteries and veins.

Br J Plast Surg 49: 34-40

Neil DA, Lynch SV, Hardie IR, Effeney DJ (2000)

Endothelium during microarterial graft procurement and transplantation.

Microsurgery 20 (3): 121-125

Newby AC, Zaltsman AB (2000)

Molecular mechanisms in intimal hyperplasia.

J Pathol 190: 300-309

O'Brien BM (1977)

Microvascular reconstructive surgery.

Churchill Livingstone, New York

Olsson E, Sarlomo-Rikala M, Böhling T, Asko-Seljavaara S, Lassila R (2000)

Immunohistochemical evaluation of failed vessel anastomoses in clinical microsurgery.

Brit J Plast Surg 53: 567-573

Riediger D, Schlote W (1981)

Pathomorphologische Veränderungen in der Gefäßwand nach mikrochirurgischer Naht im Tierexperiment.

Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 4: 233-237

Sakata N, Kawamura K, Takebayashi S (1990)

Effects of collagen matrix on proliferation and differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro.

Exp Mol Pathol 52:179-191

Sankey EA, Barnes MJ (1984)

Comparison of the collagenous products synthesized in culture by pig aortic endothelial and smooth muscle cells: variability in endothelial cell culture.

Biochem J 218: 11-18

Sokoloff A (1893)

Über die Bedingungen der Bindegewebsneubildung in der Intima doppelt unterbundener Arterien

Beitr Path Anat 14: 11

Stehbens WE (1995)

Thrombosis and vascular trauma.

In: Stehbens WE & JT Lie (eds) "Vascular Pathology", Chapman & Hall, London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melburne-Madras, p.63-87

Strauch N, Murray DE (1967)

Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than one mm in external diameter using microsurgical techniques.

Plast Reconstr Surg 40: 325-329

Tamaki M, Tamashiro M, Kamada Y, Koja K, Kusaba A (1999)

Distribution and Localization of Cells and Collagens in the Proliferated Intima of Arterially Implanted Autovein Grafts.

Jpn J Surg 29: 614-625

Thurston JB, Buncke HJ, Chater NL, Weinstein PR (1976)

A scanning electron microscopic study of microarterial damage and repair.

Plast Reconstr Surg 57: 197

Vestweber D (2000)

Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts.

J Pathol 190: 281-291

Witte MB, Barbul A (1997)

General principles of wound healing.

Surg Clin North Am 77: 509-528

Wolinsky H, Glagov S (1964)

Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media.

Circ Res 14: 400-413

Yang CL, Bodo M, Notbohm H, Peng A, Müller PK (1991)

Fulvic acid disturbs processing of procollagen II in articular cartilage of embryonic chicken and may also cause Kashin-Beck disease.

Eur J Biochem 202 (3): 1141-1146

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. R.E. Friedrich, Oberarzt der Klinik für MKG-Chirurgie, Nordwestdeutsche Kieferklinik, UKE, danke ich für die Überlassung des Themas, für die intensive wissenschaftliche Betreuung, für anregende Diskussionen und insbesondere für die zügige Korrektur.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. Schmelzle, Direktor der Klinik für MKG-Chirurgie, Nordwestdeutsche Kieferklinik, UKE, danke ich für die Erlaubnis, wesentliche Arbeiten in dem histologischen Labor der Klinik durchführen zu können.

Frau Dr. K. Röser, Abt. für Gynäkopathologie, ehemals Abt. für Oralpathologie, UKE, danke ich für die Einarbeitung und Mithilfe bei der Immunhistochemie.

Herrn Prof. P.K. Müller, Institut für Medizinische Molekularbiologie, Medizinische Universität zu Lübeck, danke ich für den freundlicherweise zur Verfügung gestellten Kollagen-IV-Antikörper.

Anja und meinen Eltern danke ich insbesondere für die Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

28.Sept. 1971	Geboren in Georgsmarienhütte, Kreis Osnabrück, Klavierunterricht vom 6.- 19. Lebensjahr, darunter zweimalige Teilnahme an der „Jugend musiziert“- Regionalausscheidung
Aug. `82- Juni `91	Besuch des Graf-Adolf-Gymnasium in Tecklenburg
Juni 1991	Abitur
Juli `91- Okt. `92	Zivildienst in der Paracelsus-Klinik in Osnabrück,
Okt. 1992	Beginn des Zahnmedizinstudiums in Aachen, parallel externes Humanmedizinstudium in Aachen,
Okt. `93	naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung an der RWTH Aachen
März 1995	Ärztliche Vorprüfung an der RWTH Aachen
März 1995	Zahnärztliche Vorprüfung an der RWTH Aachen
März 1996	1. Staatsexamen in Humanmedizin an der RWTH Aachen
Juli `97- Nov. `97	Staatsexamen in Zahnmedizin an der RWTH Aachen
Dez. 1997	Approbation als Zahnarzt (Bezirksregierung Köln)
März 1998	2. Staatsexamen in Humanmedizin an der RWTH Aachen
April `98- März `99	Praktisches Jahr an der Uni Hamburg
April 1999	3. Staatsexamen in Humanmedizin an der Uni Hamburg
Mai `99- Okt. `00	Arzt im Praktikum in der Nordwestdeutschen Kieferklinik, UKE
Nov. 2000	Approbation als Arzt
Seit Nov. `00	Assistenzarzt in der Nordwestdeutschen Kieferklinik, UKE
April 2001	Promotion in Humanmedizin

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.