

## Zusammenfassung

**Fragestellung:** Es war das Ziel dieser Untersuchung, den Nachweis von Laminin in experimentellen mikrovaskulären Anastomosen zu führen. **Material und Methode:** Autointerponate (4 mm) der linken A. carotis communis von 20 Wistar-Ratten wurden 4 Wochen nach dem Eingriff nach Perfusionsfixierung immunhistochemisch auf den Nachweis von Laminin untersucht. **Ergebnisse:** Es konnte gezeigt werden, daß der Nachweis und das Verteilungsmuster des Laminins die Qualität jeder einzelnen Naht widerspiegeln. Im Bereich der Intima war eine bindegewebsreiche Neubildung v. a. lumenseitig ausgebildet und abhängig vom Abstand und der Vitalität der Gefäßstümpfe. Die Media hatte in ihrer Achsenrichtung die geringste reparative Potenz zur Behebung der Kontinuitätsunterbrechung. Die ausgeprägte Adventitiämanschette war von zirkulär einsprossenden Laminin-positiven Vasa vasorum durchwachsen. Im Anastomosenbereich trat regelmäßig eine myointimale Hyperplasie auf, die die Schichtdicke der Media übertreffen konnte. **Schlußfolgerungen:** Die Untersuchungen belegen die Forderung nach einer atraumatischen mikrovaskulärchirurgischen Nahttechnik.

## Schlüsselwörter

Experimentelle Mikrovaskulärchirurgie · Extrazelluläre Matrixproteine · Laminin

# Nachweis von extrazellulärem Matrixprotein (Laminin) in experimentellen arteriellen Anastomosen

R. E. Friedrich<sup>1</sup>, S. Bartel-Friedrich<sup>2</sup>, K. Plambeck<sup>1</sup>, R. Schmelzle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Nordwestdeutsche Kieferklinik), (Direktor: Prof. Dr. R. Schmelzle) Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Universität Hamburg

<sup>2</sup> Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten, Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. A. Berghaus) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle an der Saale

Nach mikrochirurgischer Naht anastomosierter Gefäße heilt die Wunde im Stumpfbereich im Fall der wiederhergestellten Perfusion in typischer Weise ab [mural adhätierender Thrombus, Organisation des Endothelschadens und der (partiellen) Medianekrose, myointimale Hyperplasie, Reendothelialisierung] [1, 2, 4, 6]. Extrazelluläre Matrixproteine (EMP) haben wesentlichen Anteil an der Wundheilung [12]. Timpl et al. [16] beschrieben ein ubiquitär vorkommendes Basalmembranprotein, das als „Laminin“ bezeichnet worden ist. Laminin gehört zur Gruppe der nichtkollagenen EMP und wird auch in Gefäßwänden nachgewiesen [3]. Nach neueren Untersuchungen stellt das „klassische“ Laminin nur einen Vertreter einer Gruppe eng verwandter Proteine dar [12]. Das Verteilungsmuster dieses Laminins (Typ 1) in Gefäßwänden ähnelt dem des Kollagens IV [13]. Diese Untersuchung geht der Frage nach, ob durch den immunhistochemischen Nachweis von Laminin als einem typischen Vertreter der Basalmembranproteine Unterschiede der Heilungsvorgänge bzw. Narbenbildung mikrovaskulärer Anastomosen sichtbar zu machen sind und ob derartige Unterschiede einen Bezug zum mikroskopisch beurteilten Gefäßzustand aufweisen.

## Material und Methode

An 20 Ratten wurden mikrovaskuläre Autointerponate der A. carotis communis (ACC) exzidiert und nach Drehung um 180° mittels Einzelknüpfnähten reinseriert (Transplantatlänge: 4 mm, Fäden: 11-0, Deknatel, Hamburg). Die Durchgängigkeit der Interponate wurde 30 min nach Reperfusion mittels Mikrodopplersonographie [5, 8] geprüft. Die eigenen experimentellen Bedingungen dieses Übungsmodells der Mikrovaskularchirurgie sind detailliert beschrieben worden [5]. Alle operativen Eingriffe wurden vom Erstautor vorgenommen. Vier Wochen nach der Transplantation wurden die Gefäße nach intrakardialer Perfusionsfixierung mit 4%igem, gepuffertem Formalin (108 cm Wassersäule) entnommen und in Paraffin eingebettet. 3 µm dünne Arterienlängsschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Laminin wurde immunhistochemisch nachgewiesen [polyklonaler Anti-Laminin-1-Antikörper, Sigma, Deisenhofen, Code-Nr. L-9393, Verdünnung 1:1000, Immuno: EHS (Eaglebreth Holm-Swarm) mouse sarcoma]. Als Detektionssystem wurde LSAB-2® (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Rattenspezifität des antihumanen Antikörpers für das angegebene Antigen (Kreuzreaktivität) sowie die Qualität und Optimierung des Antigennachweises wurden in Vorversuchen an Gewebeproben diverser Organe dieser Spezies (Niere, Leber, Zunge, Speicheldrüsen) im Vergleich zu Humanmaterial unter Variation der Antikörperkonzentration, Detektionssysteme, Gewebefixierung und -vorbehandlung geprüft. Schnitte dieser Kontrollorgane einschließlich Substitutionskontrollen wurden bei jeder Inkubation mitgeführt. Die ACC der unbehandelten Gegenseiten dienten als Kontrollen der Antikörperreaktion der Arterien. Als interne Kontrolle diente die Reaktion der Vasa vasorum der ACC [11].

Priv. Doz. Dr. R. E. Friedrich, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Nordwestdeutsche Kieferklinik), Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Martinstraße 52, D-20246 Hamburg

## **Demonstration of extracellular matrix protein (laminin) in experimental arterial anastomoses**

R. E. Friedrich,  
S. Bartel-Friedrich,  
K. Plambeck, R. Schmelzle

### **Summary**

**Aim:** To investigate the distribution of Laminin in experimental microvascular surgery. **Material and methods:** Autografts (4 mm) of the left common carotid artery in 20 Wistar rats were harvested after 4 weeks. The specimens were investigated immunohistochemically for the demonstration and distribution of Laminin. **Results:** The demonstration and distribution pattern of Laminin was a function of the accuracy of each single suture. In the intima, the organisation and amount of Laminin was directed to the lumen and dependent from the distance and vitality of the vessel segments' cells. The media had in its axis direction the lowest reparative potency to regenerate the continuity break. The adventitia formed a thick cuff around the anastomosis, which was circularly grown through with Laminin-positive vasa vasorum. The marked myointimal hyperplasia in the area around the anastomosis and in the entire autograft was constituted of Laminin-positive extracellular matrix. **Conclusions:** Our results support the demand for a careful and atraumatic suture technique in microvascular surgery.

### **Key words**

Experimental microvascular surgery · Extracellular matrix proteins · Laminin

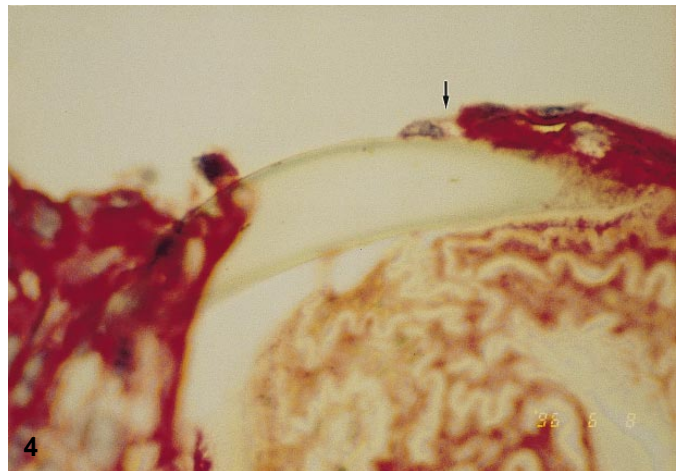
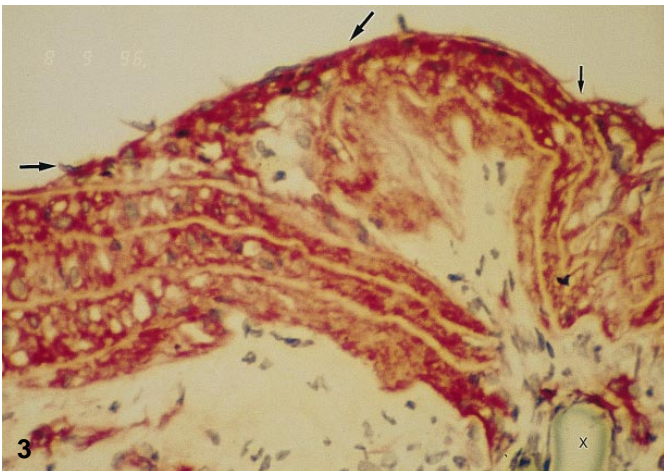
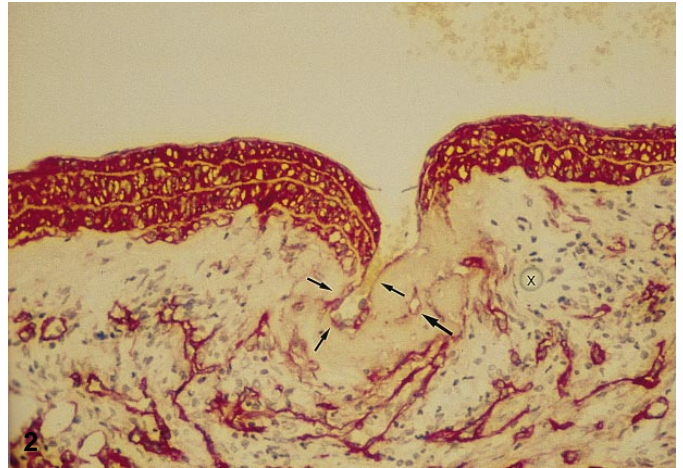
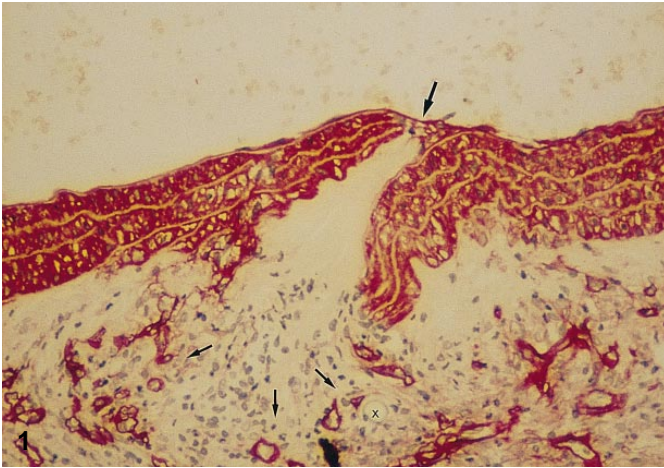
## **Ergebnisse**

Alle Interponate waren nach Reperfusion (Mikrodopplersonographie) und Perfusionsfixierung durchgängig. Bei der Explantation waren die Interponate von einer dichten Adventitia und von Narbengewebe eingeschleitet. Makroskopisch fanden sich keine Anzeichen für Aneurysmen. Mikroskopisch war in den Serienschnitten nachzuweisen, daß die individuelle Gefäßantwort auf die Durchtrennung und Gefäßnaht sich innerhalb einer Anastomose von Naht zu Naht unterscheiden konnte (spannungsfreie Adaptation, Stauchungen, Stufenbildung, sekundäre Dehiscenz, lokales Aneurysma). Die immunhistochemische Identifizierung des Laminins dieser Spezies gelang reproduzierbar am Formalin-fixierten Material. Der Nachweis und die Verteilung des Proteins korrelierten eng mit der Qualität der Anastomose bzw. dem Status der Organisation der Gefäßwunde (Abb. 1–4). An den Stellen der früheren Durchtrennung der Gefäße war die in Achsenrichtung des Gefäßes orientierte Kontinuität des Lamininnachweises immer unterbrochen. Eine breitflächige Verbindung der Gefäßstümpfe war nur zu beobachten, wenn bis zum Explantationszeitpunkt ein Zell-Zell-Kontakt der Mediaschichten erhalten geblieben war. Dagegen war bei ausgeprägten Defektheilungen, z. B. bei transmuraler Nekrose im Stumpfgebiet mit Aneurysmabildung oder sich überlappenden Stumpfenden mit sekundärem, lumenseitigem Kontakt (Abb. 1), die Regenerationsfähigkeit der extrazellulären Matrix 4 Wochen nach dem mikrovaskularchirurgischen Eingriff eingeschränkt. Positive Gewebsreaktionen für den Nachweis von Laminin waren in diesen Fällen überwiegend in lumennahen Bereichen lokalisiert. Charakteristisch war hier eine dünn markierte subendotheliale Schicht (Abb. 2). Diese spärlichen Lamininnachweise im Spaltbereich kontrastierten zur kräftigen Markierung der Mediaschicht der Gefäßstümpfe und waren zudem nicht in allen Fällen kontinuierlich, d. h. die Neointima im Anastomosenbereich konnte in Einzelfällen fokal Laminin-negativ sein. Neubildungen der extrazellulären Matrix betrafen lumenseitig v. a. die Beseiti-

gung von Strömungshindernissen (Abb. 3) einschließlich intraluminaler Nahtabschnitte (Abb. 4).

## **Diskussion**

Parallel zur Entwicklung der Mikrovaskularchirurgie war das chirurgische Interesse an der Morphologie der Gefäßveränderungen groß, aus den im Gewebepreparat abzulesenden Schäden der Gefäße und der darauf in wiederholbaren Schritten erfolgenden Wundorganisation Forderungen für den mikrochirurgischen Eingriff abzuleiten [4, 7, 9–15]. Die Gefäßwunde mikrovaskulärer Anastomosen heilt stets mit einer Narbe ab [1]. Am Aufbau einer Narbe sind EMP maßgeblich beteiligt [12, 17, 18]. Von Interesse sind die Zusammensetzung des Narbengewebes bei mikrovaskulären Anastomosen [15] und deren mögliche Abhängigkeit vom definitiven Zustand bzw. Abstand der Gefäßstümpfe. Mit immunhistochemischen Methoden sind EMP im Gewebe identifizierbar geworden [3, 10, 12, 14]. Aufgrund der konservativen Struktur dieser Stützelemente sind die Speziesvariationen des Proteinaufbaus der EMP gering [12]. Insbesondere polyklonale antihumane Antikörper sind bei optimaler Fixierung und Gewebeaufbereitung häufig für die Identifizierung der gleichen Proteine in anderen Spezies geeignet [3, 12]. Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des Laminins konnte gezeigt werden, daß trotz suffizienter Perfusionsverhältnisse im Fall von nicht optimal appositionierten Gefäßstümpfen die Defektheilung erheblich ist. Eine Überbrückung von Dehiscenzen gelingt nur über kurze Abschnitte, die offensichtlich auf die Wiederherstellung der Intima fokussiert. Die Laminin-positive Organisation der transmuralen Breite der Gefäßwand gelingt nur bei dauerhafter Anlagerung der Gefäßstümpfe, z. B. bei deren Eversion (Abb. 3). Liegen diese Verhältnisse nicht vor, ist dieses EMP im Gefäßwandbereich außerhalb der Intima nicht oder nur fokal nachweisbar. Dagegen ist die Adventitiamanschette der Anastomose reichlich mit Laminin-positiven Gefäßen durchsetzt. Die vorgestellten Proteinnachweise unterstützen eindrücklich die Forderung nach einer atrauma-



**Abb. 1.** Überlappende Gefäßstümpfe der ACC. Der gegen Laminin gerichtete Antikörper markiert kräftig die Media der A. carotis communis sowie die Gefäßwände der Vasa vasorum, die in die Wunde aus der Adventitia zirkular einsprossen (*kleine Pfeile*); fehlende Identifikation von Antigenen in dem dreieckförmigen avaskulären Bereich direkt zwischen den dehiszenten Gefäßstümpfen. Dagegen überbrückt lumenseitig ein schmaler Laminin-positiver Saum die Gefäßwandlücke, und zwar von dem äußersten, sich im Mediabereich verjüngenden Gefäßstumpfende der linken Seite zur zentrifugal abknickenden Media des Stumpfs der rechten Seite (*großer Pfeil*). An dieser Nahtstelle kann nicht entschieden werden, ob es sich hierbei um Reste primär aneinandergelagerter Stumpfenden handelt, die sich nach Reperfusion unter Zugspannung dehnten, oder ob der schmale Gefäßspalt bei primärer Dehiszenz der Stumpfenden durch neu gebildete extrazelluläre Matrix organisiert wurde. Am unteren Bildrand ist eine Naht quer durchschnitten (x). Explantation nach 4 Wochen. LSAB-2, primäre Vergr. 67 : 1

**Abb. 2.** Medianekrose mit aneurysmatischer Aussackung im Anastomosenbereich. Eine neu gebildete Laminin-positiv luminal Schicht der Gefäßwandausbuchtung (*kleine Pfeile*) grenzt kontinuierlich das in Organisation befindliche Gewebe der Gefäßstümpfe vom Gefäßinhalt ab. Innerhalb der Nekrose sind fokale Laminin-positiv Areale Indikatoren der bindegewebigen Organisation (Gefäße, *großer Pfeil*). Die verdickte Adventitia im Anastomosenbereich ist von einem dichten Netzwerk Laminin-positiv Gefäße durchbaut. Gegenseite des in Abb. 1. reproduzierten Interponatausschnittes, x Nahtquerschnitt. LSAB-2, primäre Vergr. 67 : 1

**Abb. 3.** Unebenheiten des Lumens. Stufen der approximierten bzw. evertierten Gefäßstümpfe (*große Pfeile*) oder Einziehungen der Gefäßwand infolge des Nahtzugs (*kleiner Pfeil*) werden durch eine Laminin-positiv Matrix nivelliert. An diesen Stellen ist die Neubildung der extrazellulären Matrix eindeutig nachgewiesen. Am rechten Gefäßstumpf ist eine Naht im Anschnitt getroffen (x), die von teilweise Laminin-positiv Matrix eingebettet ist. LSAB-2, primäre Vergr. 134 : 1

**Abb. 4.** Überwachsen des das Lumen durchquerenden Fadens durch Laminin-positiv extrazelluläre Matrix. Man beachte die feine membranbetonte und interzelluläre Antigenidentifikation an der direkt auf der Naht adhären den Bindegewebszelle (*Pfeil*). Die gewebefreie Fläche unterhalb des Fadens ist ein Artefakt der Präparation. Unterhalb des Fadens sind komprimierte Mediaschichten erfaßt. LSAB-2, primäre Vergr. 268 : 1

tischen und optimal appositionierenden Anastomosentechnik. Gegenwärtige Untersuchungen gelten dem Nachweis von EMP kurz nach Reperfusion der Anastomosen sowie nach deren langfristiger Funktion.

Die Autoren danken B. Makareinis und A. Voigt für ihre ausgezeichnete technische Assistenz. Die Untersuchungen wurden durch eine Sachmittelbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Projekt FR 1035/1-2).

## Literatur

1. Acland RD, Trachtenberg L (1977) The histopathology of small arteries following experimental microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg* 60 : 868–875
2. Dirrenberger R, Sundt T (1978) Carotid endarterectomy – temporal profile of the healing process and effect of anticoagulation therapy. *J Neurosurg* 48 : 201
3. Ekblom P, Miettinen M, Rapola J, Foidart J-M (1982) Demonstration of laminin, a basement membrane glycoprotein, in routinely processed formalin-fixed tissues. *Histochemistry* 75 : 301–307

4. Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ (1975) Endothelial regeneration and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 32:339–351
5. Friedrich RE, Plambeck K, Bartel-Friedrich S, Hellner D, Schmelzle R (1997) Einsatz von Autointerponaten nach akuter Schädigung der Arteria carotis communis. Experimentelle mikrovaskuläre Anastomosen nach Ballondilatation. *Unfallchirurgie* 23:1–9
6. Hiller PM (1986) Histologische Untersuchungen der Arteria carotis von Ratten nach Bestrahlung und mikrochirurgischer Gefäßanastomose. Med Dissertation, Universität Tübingen
7. Imparato AM, Bracco A, Kim GE, Zeff R (1972) Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery* 72:1007–1017
8. Jones BM, Greenhalgh RM (1983) The use of the ultrasound Doppler flowmeter in reconstructive microvascular surgery. *Br J Plast Surg* 36:245–253
9. Lidman D, Daniel RK (1981) The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg* 15:103–110
10. Madri JA, Dreyer B, Pitlick FA, Furthmayr H (1980) The collagenous components of the subendothelium. *Lab Invest* 43:303–315
11. Minderjahn A (1983) Morphometrische und autoradiographische Untersuchungen zur Endothelregeneration. In: Pfeifer G, Schwenzler N (Hrsg) Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie, Band XXVIII. Thieme, Stuttgart New York, S 137–139
12. Nerlich A (1995) Morphologie von Basalmembran- und -assoziierten Matrixproteinen in normalem und pathologischem Gewebe. Fischer, Stuttgart Jena New York, S 11ff
13. Palotie A, Tryggvason K, Peltonen L, Seppä H (1983) Components of subendothelial aorta basement membrane. Immunohistochemical localization and role in cell attachment. *Lab Invest* 49:362–370
14. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V (1992) Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation [Suppl III]* 86:III-43–III-46
15. Shibahara T, Schmelzeisen R, Noma H (1996) Histological changes in vessels used for microvascular reconstruction in the head and neck. *J Craniomaxillofac Surg* 24:24–28
16. Timpl R, Rhode H, Gehron Robey P, Renard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin – a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254:9933–9937
17. Webster WS, Bishop SP, Geer JC (1974) Experimental aortic intimal thickening. I. Morphology and source of intimal cells. *Am J Pathol* 76:245–264
18. Webster WS, Bishop SP, Geer JC (1974) Experimental aortic intimal thickening. II. Endothelialization and permeability. *Am J Pathol* 76:265–284