

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**Entwicklung eines extrakorporalen Perfusionssystems
zur Vitalerhaltung freier Gewebetransplantate im Kleintiermodell**

Dr. med. Andreas Maximilian Fichter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. T. Mücke
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 28.01.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.06.2015 angenommen.

„Wegen der vielen Maschinen und Apparate hat der Patient immer weniger Kontakt zum Arzt. Diese Entwicklung hat aber auch Nachteile.“

Gerhard Kocher

Gewidmet der MF6 und der Sieben

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, WO507/4-1) gefördert.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Verwendete Abkürzungen

A.	<u>A</u> rterie	N.	<u>N</u> ervus
Abb.	<u>A</u> bbildung	NIR	<u>N</u> ahinfrarotbereich
ACT	<u>A</u> ctivated <u>c</u> lotting <u>t</u> ime	o.g.	<u>o</u> ben <u>g</u> enannt
BE	<u>B</u> asenüberschuss (<i>engl.</i> <u>b</u> ase <u>e</u> xcess)	O2C	<u>O</u> xygen <u>t</u> o <u>s</u> ee
BGA	<u>B</u> lutgas <u>a</u> nalyse	OP	<u>O</u> peration
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise	p.o	<u>p</u> er <u>o</u> s
d.h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt	pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
dt.	<u>d</u> eutsch	pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ECMO	<u>E</u> xtrakorporale <u>M</u> embran <u>o</u> xyge- nation	PTT	Partielle Thromboplastin Zeit (<i>engl.</i> <u>p</u> artial <u>t</u> hromboplastin <u>t</u> ime)
ECP	<u>E</u> xtrakorporale <u>P</u> erfusion	R.	<u>R</u> amus (Ast)
engl.	<u>e</u> nglisch	s.c.	<u>S</u> ub <u>k</u> utan
etc.	<u>e</u> t <u>c</u> etera	s.o.	<u>s</u> iehe <u>o</u> ben
Hb	<u>H</u> ämoglobin	SD	<u>S</u> tandardabweichung (<i>engl.</i> <u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat (Bicarbonat)	SO ₂	Sauerstoffsättigung
HE	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin Färbung	sog.	<u>s</u> ogenannt
HES	<u>H</u> ydroxyethyl <u>s</u> tärke	Tab.	<u>T</u> abelle
Hk	<u>H</u> ämatokrit	u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
ICG	<u>I</u> ndocyanin- <u>G</u> rün	V.	<u>V</u> ene
IL	<u>I</u> nterleukin	v.a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
KGW	<u>K</u> örper <u>g</u> ewicht	VAC	<u>V</u> acuum <u>a</u> ssisted <u>c</u> losure
lat.	<u>l</u> ateinisch	vgl.	<u>v</u> ergleiche
LDH	<u>L</u> aktat <u>d</u> ehydrogenase	vs.	<u>v</u> ersus
M.	<u>M</u> usculus	z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
MO	<u>M</u> embran <u>o</u> xygenator	z.i.	<u>z</u> itiert <u>i</u> n (= Sekundärzitat)
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert		
n	Anzahl, Gruppengröße		

Verwendete Einheiten

%	Prozent	M	Molar
%(w/v)	Massenprozent/ Volumenprozent	m	Meter
°C	Grad Celsius	m	Meter
AU	<u>A</u> rbitrary <u>U</u> nits	min	Minute
cm	Zentimeter	ml	Milliliter
d	Tag	mm	Millimeter
g	Gramm	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
G	<u>G</u> auge	nm	Nanometer
h	Stunde	Pa	Pascal
I.E.	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheiten	px	Pixel
k	Kilo	s	Sekunden
kD	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton	μ	Mikro
l	Liter	μm ²	Quadratmikrometer

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Rekonstruktive Therapiemöglichkeiten	2
1.2	Die Grenzen der rekonstruktiven Mikrochirurgie	7
1.2.1	Neck Dissection und Voroperationen am Hals	7
1.2.2	Strahlentherapie und Wundheilung	7
1.2.3	Vessel depleted neck	8
1.3	Therapiemöglichkeiten in chirurgischen Grenzbereichen	9
1.3.1	Die rekonstruktive Leiter rückwärts	10
1.3.2	Mikrochirurgische Optionen trotz fehlender lokaler Gefäße	16
1.3.3	Mikrovaskuläre Lappen ohne lokalen Gefäßanschluss	26
1.4	Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	28
2	Material und Methodik	31
2.1	Studienaufbau	31
2.2	Vorversuche	31
2.2.1	Entwicklung eines Perfusionssystems zur Gewebeerhaltung	31
2.2.2	Aufbau des verwendeten Perfusionssystems	35
2.2.3	<i>In vitro</i> Evaluation des Perfusionssystems	37
2.3	Vitalerhaltung mikrovaskulärer Lappen im Rattenmodell	42
2.3.1	Experimentelles Protokoll	42
2.3.2	Versuchstiere und Haltung	43
2.3.3	Versuchsmodell und Anatomie	43
2.3.4	Evaluationsmethoden	43
2.3.5	Operative Methoden	49
2.3.6	Perfusionsprotokoll	56
2.4	Statistische Auswertung	58
2.5	Verwendete Materialien und Geräte	59
2.5.1	Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen	59
3	Ergebnisse	65
3.1	<i>In vitro</i> Evaluation des Perfusionssystems	65
3.1.1	Flussgeschwindigkeit	65
3.1.2	Laborchemische Veränderungen und Hämolyse	66
3.2	Extrakorporale Perfusion mikrovaskulärer Lappen	70
3.2.1	Klinische Beobachtungen	70
3.2.2	Nekroserate	73

3.2.3	Blutgasanalyse und laborchemische Untersuchungen	74
3.2.4	Gewebe-Photospektrometrie	80
3.2.5	Indocyanin-grün-Videoangiographie	89
3.2.6	Histologie	93
4	Diskussion	95
4.1	Problemstellung.....	95
4.2	Literaturüberblick	97
4.2.1	Tierexperimentelle Erfahrungen.....	98
4.2.2	Klinische Anwendung.....	107
4.3	Entwicklung des verwendeten Systems.....	108
4.3.1	Simulation möglichst physiologischer Bedingungen	110
4.3.2	Vermeidung mikrobieller Besiedelung.....	120
4.3.3	Kontinuierliche Dokumentation	121
4.3.4	Mobiles Design und einfache Bedienung.....	121
4.4	Eigene Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	122
4.4.1	Etablierung des Modells.....	122
4.4.2	Beobachtungen zu Beginn der Perfusion.....	123
4.4.3	Vorgänge während extrakorporaler Perfusion	123
4.4.4	Ergebnisse nach sieben Tagen.....	130
4.4.5	Zusammenfassende Beurteilung der eigenen Ergebnisse	131
4.5	Ausblick und alternative Anwendungsmöglichkeiten	132
4.5.1	Gewebe- und Extremitätenreplantation.....	133
4.5.2	Überbrückung der Ischämiezeit in Notfallsituationen	134
4.5.3	Lappenmonitoring und Tweaking	135
4.5.4	Isolierte Perfusion einzelner Regionen	137
4.5.5	Lehr- und Trainingsmodell	138
4.5.6	Einsparung von Tierversuchen	138
4.5.7	Grundlagenforschungsmodell	138
4.6	Fazit.....	139
	Zusammenfassung	140
	Summary.....	141
	Anhang.....	143
	Abbildungsverzeichnis.....	161

1 EINLEITUNG

Mit der Entwicklung der mikrovaskulären Transplantationstechnik vor 40 Jahren steht uns heute ein großes Arsenal körpereigener Gewebe für die Rekonstruktion aller erdenklichen Defektkonstellationen zur Verfügung. Doch diese Technik ist auf das Vorhandensein zuverlässiger Anschlussgefäße vor Ort angewiesen. Ablative Operationen, schwere Traumen, Verbrennungen, Fehlbildungen oder Gefäßerkrankungen können dazu führen, dass adäquate Anschlussgefäße fehlen und eine freie Gewebetransplantation unmöglich wird. Zwar existieren eine Reihe von Reservemethoden, doch sind diese Techniken mit teils erheblichen Nachteilen verbunden und führen in der Regel zu schlechteren funktionellen und ästhetischen Ergebnissen.

Durch Fortschritte in der Transplantationsmedizin ist heute die mehrtägige Vitalkonservierung von Organen (HOSGOOD UND NICHOLSON 2011; NICHOLSON UND HOSGOOD 2013; HOSGOOD UND NICHOLSON 2014) und Geweben (MAYER *et al.* 1994; MULLER *et al.* 2013) über einen extrakorporalen Kreislauf möglich. Zudem ist bekannt, dass ausreichend vaskularisierte Gewebelöcke innerhalb kurzer Zeit in einen Defekt einheilen und dort unabhängig von den ursprünglich versorgenden Blutgefäßen werden können (BALLANTYNE *et al.* 1980; MÜCKE *et al.* 2011; BLACK *et al.* 1978; WOLFF *et al.* 2009). Aus der Kombination dieser beiden Feststellungen eröffnet sich eine interessante neue Therpiemöglichkeit: die Transplantation freier, extrakorporal perfundierter Gewebe ohne mikrovaskulären Gefäßanschluss. Die Blutversorgung müsste dann über den Zeitraum aufrechterhalten werden, den das Gewebe benötigt um in den Defekt einzuheilen und dort zu autonomisieren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits die Eignung eines solchen Systems als Trainingsmodell für die Ausbildung rekonstruktiv tätiger Chirurgen durch Simulation lebensechter Präparationsverhältnisse an Kadavern demonstrieren (WOLFF *et al.* 2014) und in einer Pilotstudie erste erfolgreiche Replantationen epigastrischer Lappen im Rattenmodell nach mehrstündiger extrakorporaler Perfusion mit einer früheren Version des in dieser Arbeit verwendeten Systems erzielen (MÜCKE 2013).

Die vorliegende Studie beschäftigt sich in einem ersten Teil mit der Entwicklung eines neuartigen membranoxxygenierten extrakorporalen Miniaturperfusionssystems für den Vitalerhalt freier Lappen im Kleintiermodell sowie mit der *in vitro* Evaluation dieses Systems an murinem und humanem Vollblut. Im zweiten, und eigentlichen Hauptteil der vorliegenden Arbeit wird die *in vivo* Anwendung des entwickelten Systems zur Vitalerhaltung epigastrischer Lappen in der Ratte beschrieben und die Vorgänge innerhalb des Lappens und innerhalb des Perfusats während extrakorporaler Perfusion analysiert.

1.1 REKONSTRUKTIVE THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Ausgedehnte Tumorresektionen und Traumata resultieren häufig in großen, teils entstellenden weichteiligen oder knöchernen Defektsituationen, die eine Rekonstruktion erforderlich machen. Die rekonstruktive Chirurgie bietet heute eine große Auswahl an Rekonstruktionsmethoden, deren detaillierte Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Doch selbst heute stoßen wir trotz der großen Fortschritte in der rekonstruktiven Mikrochirurgie nach wie vor in manchen Fällen an unsere Grenzen.

Als Entscheidungshilfe für die Wahl der korrekten Operationsmethode im Einzelfall bedient sich der rekonstruktiv tätige Chirurg häufig der „rekonstruktiven Leiter“ (Abb. 1.1A). Dabei handelt es sich um ein gedankliches Stufenmodell, das die zur Verfügung stehenden rekonstruktiven Therapiemöglichkeiten geordnet nach der Komplexität und Invasivität der Methode (bzw. des Defekts) darstellen soll. Historische Beschreibungen beginnen meist mit Wundverschluss mit sekundärer Intention, gefolgt von direktem Wundverschluss, lokalen Lappenplastiken und Fernlappen. Mit den technischen und chirurgischen Weiterentwicklungen sind heute weitere Sprossen zur rekonstruktiven Leiter hinzugekommen. Manche dieser Neuerungen wie künstliche Hauttransplantate, Vakuumtherapie oder Gewebeexpansion, die heute gelegentlich Anwendung finden, lassen sich nicht eindeutig zuordnen (Abb. 1.1). Bei der Entscheidung welche Methode in welcher Situation geeignet ist, kann jedoch nicht streng nach einem Stufenschema erfolgen, sondern es müssen zahlreiche Faktoren bei der Planung der Rekonstruktion berücksichtigt werden. Dazu zählen die Lokalisation und Art der Wunde, der Allgemeinzustand des Patienten, das gewünschte funktionelle Ergebnis, Erfahrung und Fähigkeiten des behandelnden Chirurgen, die zur Verfügung stehenden personellen, räumlichen und ökonomischen Möglichkeiten peri- und postoperativ sowie die Wünsche des Patienten und dessen Bereitschaft sich einer langen Operation und mehrwöchigen postoperativen Rehabilitation zu unterziehen (JANIS *et al.* 2011). Im Folgenden sollen die wichtigsten zur Verfügung stehenden rekonstruktiven Methoden in ihren Grundzügen beschrieben werden.

Beim sekundären Wundverschluss, oder Wundverschluss mit sekundärer Intention (*lat. sanatio per secundam intentionem*) wird die Wunde nicht operativ versorgt, sondern sauber und infektfrei gehalten, klinisch beobachtet und eine Wundheilung über die Bildung von Granulationsgewebe oder Epithelisierung vom Wundrandbereich bzw. über Hautanhangsgebilde abgewartet. Die Heilung erfolgt narbig, erfordert viel Zeit und nicht selten ist eine operative Versorgung im Intervall notwendig. Diese Methode kommt beispielsweise bei Schürfwunden, nach Spalthautentnahme oder nach Resektionen der Mukosa am harten Gaumen (mit Eingliederung einer Gaumenplatte) zum Einsatz.

Beim primären Wundverschluss werden die Wundränder nach Wundreinigung und ggf. Wundumschneidung adaptiert und mit Nähten oder Klammern fixiert. Der primäre Wundverschluss ist mit der geringsten Narbenbildung verbunden und stellt die Methode der Wahl beim Verschluss einfacher Verletzungen (z.B. Schnittwunden) oder Operationswunden ohne Defektzone dar.

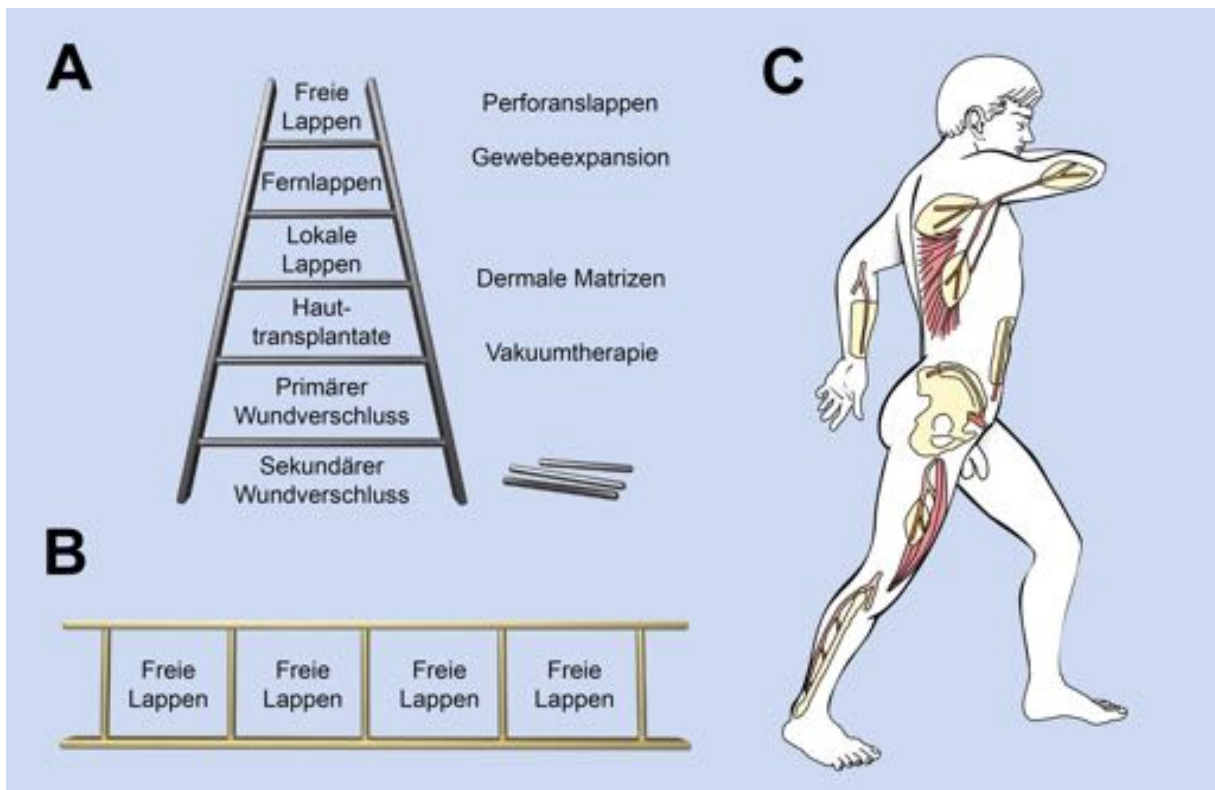


Abb. 1.1: Die rekonstruktive Leiter. Die rekonstruktive Leiter ist ein gedankliches Modell, das die rekonstruktiven Therapiemöglichkeiten geordnet nach deren Komplexität darstellen soll. In der Regel wird ein Vorgehen Sprosse für Sprosse von unten nach oben von der am wenigsten invasiven zu immer invasiveren Methoden empfohlen. (A) Neuere Wundversorgungsmöglichkeiten wie Gewebeexpansion, Unterdruck-Wundtherapie und Hautmatrix-Verbände verdienen heute ebenfalls eine Sprosse auf der therapeutischen Leiter. Schematische Darstellung modifiziert nach JANIS *et al.* (2011). (B) Die großen Erfolge in der Mikrochirurgie spiegeln sich in vielen Kliniken auch in der Wahl der rekonstruktiven Methoden wieder. (C) Der „Lappenmann“: Darstellung wichtiger mikrochirurgischer Lappen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Dr. K.-D. WOLFF, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Klinikum rechts der Isar, München.

Lässt sich die Wunde durch Adaptation der Wundränder selbst nach Mobilisierung der Wundränder nicht oder nur unter Spannung verschließen, kommen lokale Lappenplastiken in Betracht (Abb. 1.2A und B). Hierbei wird das umliegende Gewebe mobilisiert und in den Defekt verschoben (Verschiebelappen), rotiert (Rotationslappen) oder transponiert (Transpositionslappen). Da sich lokale Lappenplastiken dem Gewebe der unmittelbaren Umgebung des Defekts bedienen und Hautmaserung und Colorit daher meist dem ursprünglichen Zustand des zu ersetzenden Gewebes entsprechen, führt diese Methode in der Regel ebenfalls zu guten ästhetischen Ergebnissen. Nach dem vaskulären Versorgungsmuster werden zwei Typen lokaler Lappen unterschieden. Lappen, deren Gefäßversorgung aus einem zufallsverteilten Gefäßnetz der regionären Haut erfolgt, werden als „random pattern flaps“ bezeichnet.

Bei der Hebung darf ein Längenbreitenverhältnis von etwa 2:1, im gut durchbluteten Gesichtsbereich von 3:1 nicht überschritten werden, um die vaskuläre Versorgung eines „random pattern flaps“ nicht zu gefährden (DAVID H. SONG *et al.* 2007). Deshalb sind solche Lappen nur für kleinere Defektareale geeignet. Typische Beispiele solcher Lappen sind Z-Plastiken, VY-Plastiken und U-Lappen (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012). Davon unterschieden werden lokale Lappen, die auf einem definierten Gefäß beruhen, sog. „axial pattern flaps“. Das Angebot solcher Lappen ist begrenzt, dafür sind „axial pattern flaps“ von den Dimensionsbegrenzung der „random pattern flaps“ nicht betroffen und entsprechend vielseitig einsetzbar (BLONDEEL *et al.* 1997; DAVID H. SONG *et al.* 2007; HAYDEN UND NAGEL 2013). Der auf der A. temporalis superficialis basierende Temporalislappen wurde 1963 als erster solcher „axial pattern flap“ für die Rekonstruktion der Mundhöhle nach Resektion von Mundhöhlenkarzinomen beschrieben (MCGREGOR 1963). Ein zweiter häufig verwendeter „axial pattern flap“ ist der von AYMARD 1917 erstmals beschriebene und 1965 nach Verwendung für die pharyngoösophageale Rekonstruktion nach Laryngopharyngektomie durch BAKAMJIAN populär gewordene Deltopektorallappen. Der auch als „Bakamjian flap“ bekannte Lappen war zur Zeit seiner Beschreibung eine Sensation, da er die Zuverlässigkeit des Temporalislappens mit einer geringeren Hebemorbidity verbindet, zumal die Entnahmestelle nicht im Gesicht, sondern auf der Schulter lokalisiert ist (HAYDEN UND NAGEL 2013). Ein weiteres wichtiges Beispiel ist der auf der A. supratrochlearis basierende Stirnlappen, der für Rekonstruktionen der äußeren Nase einen hohen Stellenwert hat.

Oberflächliche Defekte mit gut perfundiertem Wundgrund in ästhetisch weniger kritischen Bereichen lassen sich auch mit freien Hauttransplantaten decken. Man unterscheidet Spalthauttransplantate, bestehend aus der Epidermis und Vollhauttransplantate, bestehend aus Epidermis und Teilen der Dermis (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012). Reine Hauttransplantate können ohne Gefäßanschluss transplantiert werden. Während Spalthautentnahmestellen vergleichbar mit Schürfwunden in der Regel folgenlos abheilen (*lat.* restitutio ad integrum), müssen Vollhautentnahmestellen primär verschlossen werden und hinterlassen Narben. Beide Methoden neigen in unterschiedlichem Ausmaß zu Gewebeschrumpfung und sind lokalen Rekonstruktionsmaßnahmen ästhetisch unterlegen. Zudem setzen beide Methoden ein sicheres, gut durchblutetes Wundbett voraus und sind zur Rekonstruktion großer gemischtgewebiger Defekte ungeeignet.

Mit der Beschreibung unabhängiger myokutaner vaskulärer Territorien des Körpers öffneten MCCRAW *et al.* 1977 die Tür zur Entwicklung einer neuen Generation axial gestielter Lappen, den gestielten myokutanen Fernlappen (z.i. HAYDEN UND NAGEL 2013). Die breite Adaptation dieser Stiellappen, allen voran des gestielten Pectoralis-major-Lappens (ARIYAN 1979) brachte Ende der 1970er Jahre vorübergehend sogar die klinische Anwendung mikrochirur-

gischer Techniken nahezu zum Erliegen (HAYDEN UND NAGEL 2013). Weitere, in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie heute noch relevante Beispiele sind der Trapeziuslappen (CONLEY 1972) und der Latissimus-dorsi-Lappen (QUILLEN *et al.* 1978). Da die Hautinsel vollständig umschnitten werden kann, werden diese Lappen auch als Insellappen bezeichnet. Diese myokutanen „Insellappen“ sind zuverlässig, schnell und einfach zu heben und lassen sich ohne mikrochirurgische Fähigkeiten transplantieren. Der kurze Siegeszug myokutaner Stiellappen in der Kopf-Hals-Chirurgie endete Anfang der 1980er Jahre als klar wurde, dass eine rein weichteilige Deckung einer Rekonstruktionsplatte nach Unterkieferkontinuitätsresektion zu keinem langfristigen Erfolg führt (HAYDEN UND NAGEL 2013).

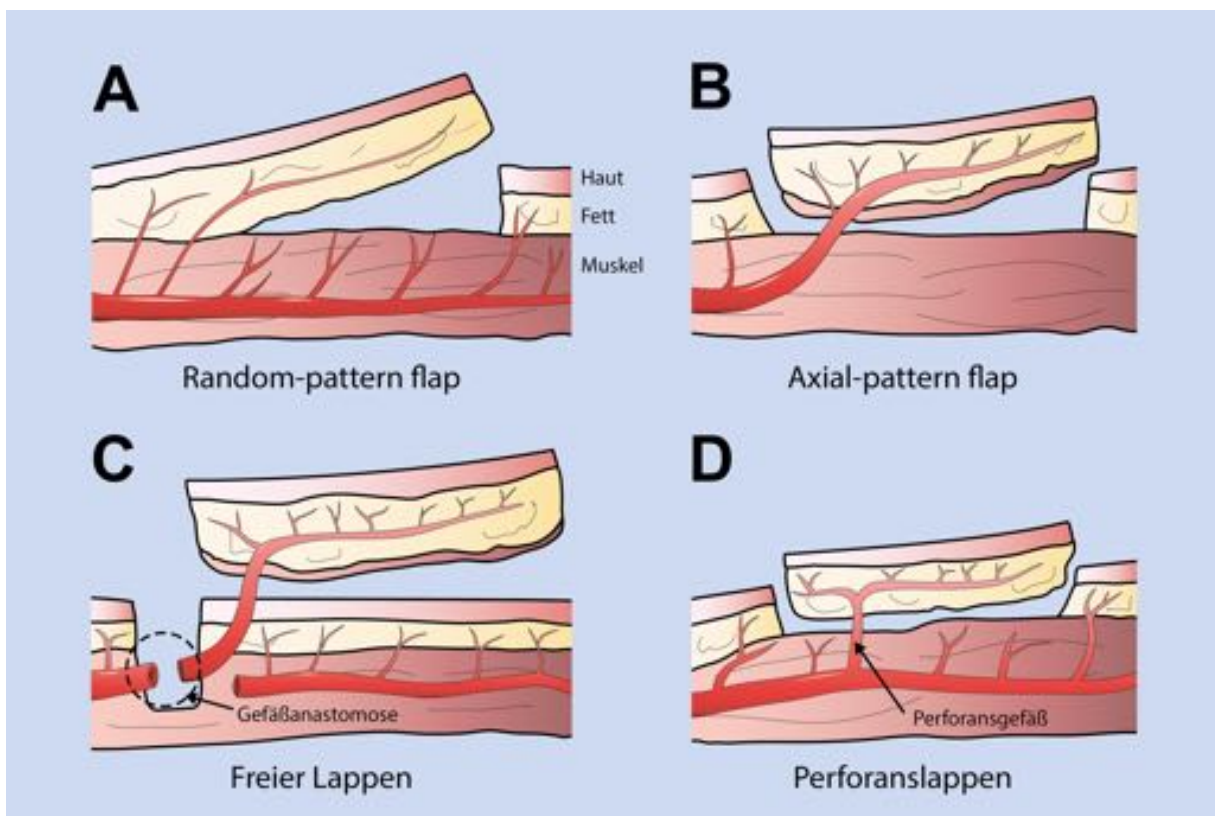


Abb. 1.2: Lokale und freie Lappen. (A) Random-pattern flap. Die Blutversorgung kommt von keiner definierten Arterie, sondern von zahlreichen namenlosen kleinen Gefäßen. Viele lokale Hautlappen fallen unter diese Kategorie. (B) Axial-pattern flap. Die Blutversorgung erfolgt über eine definierte Arterie. Die meisten Muskellappen verfügen über eine axiale Versorgung. (C) Freier Lappen. Freie Lappen sind definiert als Transfer von Gewebe unter temporärer Durchtrennung der Gefäßversorgung und Wiederherstellung der Gefäßversorgung am Zielort. (D) Perforanslappen. Die versorgenden Gefäße sind isolierte Perforansgefäße aus dem tiefen Gefäßsystem, die durch die Muskulatur oder intermuskuläre Septen an die Oberfläche gelangen. Modifiziert aus CHAN UND CHAN (2014).

Die wichtigste therapeutische Neuerung der letzten Jahrzehnte und gleichzeitig die oberste Sprosse der rekonstruktiven Leiter (Abb. 1.1A bis C und Abb. 1.2C) ist die Möglichkeit der Transplantation mikrovaskulär anastomosierter freier Lappen. SEIDENBERG *et al.* (1959) führten die Technik der freien Gewebetransplantation ein, wobei sie ein freies Jejunumsegment für die Rekonstruktion eines pharyngooesophagealen Defekts verwendeten. Die Technik der

freien Gewebetransplantation erlaubt das Verpflanzen unterschiedlich zusammengesetzter gesunder Gewebe (*engl.* „composite flap“) aus defektfernen Körperregionen in ein kompromittiertes Wundbett, wodurch optimale Wundheilungsbedingungen geschaffen werden (BALASUNDARAM *et al.* 2012). Je nach geweblicher Zusammensetzung des Lappens lassen sich reine Weichteillappen (fasziokutan, septokutan, myokutan) und knöcherne Lappen (rein ossär, osteomyokutan etc.) unterscheiden. Die heutzutage in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie gebräuchlichsten freien Lappen für rein weichteilige Defekte sind der „radial forearm flap“, oder Radialislappen (YANG *et al.* 1997) und der anterolaterale Oberschenkelappen (SONG *et al.* 1984). Für ausgedehnte knöcherne Rekonstruktionen bieten sich das mikrovaskuläre Fibulatransplantat (CHEN UND YAN 1983), der össäre Skapulalappen (SILVERBERG *et al.* 1985) oder der mikrovaskuläre Beckenkamm (TAYLOR UND WATSON 1978; SANDERS UND MAYOU 1979) an. (Abb. 1.1C). Eine ausführliche Aufstellung der wichtigsten mikrovaskulären Lappen findet sich in WOLFF UND HÖLZLE (2011). Die hohe Erfolgsrate und das hohe funktionelle und ästhetische Ergebnis mikrovaskulärer Rekonstruktionen spiegeln sich in vielen Kliniken auch in der Wahl der rekonstruktiven Methoden wieder (Abb. 1.1B).

Seit der Einführung sog. Perforanslappen durch KOSHIMA UND SOEDA im Jahre 1989 wurde das Spektrum der zur Verfügung stehenden freien Lappen durch eine Vielzahl solcher, in der Regel aus Haut und subkutanem Fettgewebe bestehenden Lappen erweitert (z.i. FICHTER *et al.* 2014, Abb. 1.2D). Die Versorgung dieser zusammengesetzten Lappen basiert auf einem oder mehreren Endstromgefäßen, sog. Perforatoren oder Perforansgefäßen (*lat.* perforare = durchbohren). Der Name der Perforansgefäße ist der Tatsache geschuldet, dass diese auf ihrem Weg vom Hauptgefäß in ihr Endstromgebiet eine Faszie, seltener einen Muskel perforieren (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012). Der große Vorteil dieser Transplantate liegt in der, im Vergleich zu konventionellen freien Lappen, geringeren Hebermorbidität, da Faszien, Nerven und Muskelgewebe in der Spenderregion erhalten werden können (z.i. FICHTER *et al.* 2014).

Damit stehen heute praktisch für jeden erdenklichen Defekt ein oder mehrere geeignete Rekonstruktionsmethoden zur Verfügung. Die Rekonstruktion komplexer, insbesondere knöcherner oromandibulärer Defekte bleibt jedoch mikrochirurgischen Methoden vorbehalten. Allerdings können Vorerkrankungen des Patienten, Voroperationen, schwere Traumata oder Bestrahlungen zu einer Defektkonstellation führen, bei denen selbst modernste mikrochirurgische Techniken an ihre Grenzen stoßen.

1.2 DIE GRENZEN DER REKONSTRUKTIVEN MIKROCHIRURGIE

Das Vorhandensein von Anschlussarterien und -venen mit einem adäquaten Durchmesser und ausreichendem Blutfluss innerhalb der Nachbarschaft der Defektregion ist ausschlaggebend für den Erfolg der mikrovaskulären Chirurgie mit freiem Gewebetransfer (z.i. STURTZ *et al.* 2012). Ablative Operationen und Bestrahlungen in der Kopf-Hals-Region aber auch schwere Traumen, Verbrennungen, Fehlbildungen oder Gefäßerkrankungen können dazu führen, dass adäquate Anschlussgefäße fehlen und ein mikrovaskulärer Lappentransfer nicht oder nur über Umwege möglich ist. Häufigste Ursache für eine Verarmung der Halsgefäße sind die Neck Dissection und Bestrahlungen bei Tumorpatienten (JACOBSON *et al.* 2008; MUCKE *et al.* 2012b).

1.2.1 NECK DISSECTION UND VOROPERATIONEN AM HALS

Die bei invasiven Karzinomen der Mundhöhle standardmäßig durchgeführte Neck Dissection kann das rezidivfreie Überleben verlängern (FASUNLA *et al.* 2011). Im Rahmen dieser Halslymphknotenausräumung werden jedoch arterielle und venöse Gefäße unterbunden, die für einen späteren Gefäßanschluss nicht mehr verwendet werden können. HEAD *et al.* (2002) fanden im Rahmen von Sekundäroperationen und Salvageoperationen in einem großen Patientenkollektiv in nur 39% nach erfolgter Neck Dissection brauchbare Anschlussgefäße für einen mikrovaskulären Lappentransfer auf der ipsilateralen Halsseite. Nach radikaler oder modifiziert radikaler Neck Dissection ließen sich nahezu keine brauchbaren Anschlussgefäße mehr finden (z.i. STURTZ *et al.* 2012), sodass in diesen Fällen auf die kontralaterale Halsseite ausgewichen werden musste. Bei beidseitig voroperiertem Hals ist dieses Vorgehen nicht möglich. Im voroperiertem Hals kommt erschwerend hinzu, dass durch Fibrosierungs- und Narbenprozesse die unterschiedlichen Gewebeschichten nicht mehr vollständig abgrenzbar sind, was schnell zu einer versehentlichen Gefäßverletzung potentieller Anschlussgefäße führen kann (STURTZ *et al.* 2012) und ein erhebliches Blutungsrisiko darstellt.

1.2.2 STRAHLENTHERAPIE UND WUNDHEILUNG

Ebenso wie die heute routinemäßig durchgeführte elektive Neck Dissection hatte die Einführung der adjuvanten Radio-(Chemo-)Therapie bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie Überleben (COOPER *et al.* 2004). Die Bestrahlung hat jedoch weitreichende Folgen auf das bestrahlte Gewebe wie ausgedehnte Fibrosierungen und eine eingeschränkte Wundheilung, wodurch häufig Komplikationen auftreten, die ihrerseits wieder eine chirurgische Therapie benötigen (FUJIOKA 2014). Eine detaillierte Beschreibung der Bestrahlungsfolgen auf das Gewebe aus pathophysiologischer Sicht liefern HAUBNER *et al.* (2012). Erschwert wird die chirurgische Therapie im bestrahlten Hals durch die risikoreiche Präparation im postradiogen vernarbten Gewebe und dem erhöhten Risiko

der Verletzung möglicher Anschlussgefäße (FUJIOKA 2014). Die Bestrahlung führt darüber hinaus zu endothelialen Veränderungen wie Intimafibrose wodurch Arteriosklerose begünstigt und das Gerinnungssystem aktiviert wird (KIENER *et al.* 1991; MOMENI *et al.* 2011; CHERIEX *et al.* 2013; FUJIOKA 2014; TALL *et al.* 2014). Eine strahleninduzierte chronische Endothelio-Angiitis der Empfängergefäße wird als ein Faktor diskutiert, der zu einer erhöhten Thrombosegefahr führt (RUDOLPH *et al.* 1982; TALL *et al.* 2014), die mitverantwortlich für eine signifikant erhöhte Komplikations- und Verlustrate freier Lappen nach Bestrahlung ist (TALL *et al.* 2014). Mit zunehmender Anzahl radio-(chemo-)therapierter Patienten steigt auch die Anzahl postradiogener Komplikationen. SAKURABA *et al.* (2013) sehen in der Bereitstellung entsprechender therapeutischer Maßnahmen zur Versorgung solcher Komplikationen die nächste große Herausforderung für die rekonstruktive Chirurgie.

In diesem Zusammenhang verdient das Krankheitsbild der Osteoradionekrose besondere Erwähnung. Diese radiogen induzierte Knochennekrose des Unterkiefers gilt als typische Spätfolge nach Bestrahlungen in der Kopf-Hals-Region (LYONS UND GHAZALI 2008). Die Therapie der Osteoradionekrose besteht zunächst in der Dekortikation der betroffenen Areale unter antibiotischer Begleittherapie. Nicht selten ist im Verlauf der Erkrankung jedoch eine Unterkiefer(teil)resektion erforderlich (MUCKE *et al.* 2012a; CHERIEX *et al.* 2013). Die Rekonstruktion der Unterkieferdefekte gestaltet sich in diesen Fällen aufgrund fehlender Anschlussgefäße und reduzierter Wundheilung besonders schwierig. Die Kombination aus gestielten Lappen und Rekonstruktionsplatte zur Rekonturierung des Unterkiefers bringt häufig nur einen kurzfristigen Heilerfolg und die Patienten leiden häufig an den ausgeprägten funktionellen und ästhetischen Einschränkungen (MUCKE *et al.* 2012a; CORBITT *et al.* 2014).

1.2.3 VESSEL DEPLETED NECK

Rezidive, Zweittumoren, operative oder postradiogene Komplikationen aber auch der Wunsch des Patienten nach lebensqualitätsverbessernden Maßnahmen erfordern häufig weitere operative Schritte. Wurde bei dem Patienten eine Neck Dissection oder Radiatio im Halsbereich durchgeführt, kann es in der Folge zu einem Verlust geeigneter Anschlussgefäße für einen erfolgreichen Lappentransfer kommen (HANASONO *et al.* 2009; BOURGET *et al.* 2011; MUCKE *et al.* 2012b). Das Vorhandensein von Arterien oder Venen mit suffizientem Kaliber im Bereich der Defektregion ist jedoch unabdingbar für den Erfolg mikrovaskulärer Lappenchirurgie. Dies erklärt, warum die Erfolgsquote je nach Ausgangssituation deutlich variiert; durchschnittlich werden Werte zwischen 74% und 95% in der Literatur angegeben (VILLARET UND FUTRAN 2003; SUH *et al.* 2004). In der maximalen Ausprägung, also bei völligem Fehlen relevanter Anschlussgefäße in der Halsregion, spricht man von einem gefäßverarmten Hals (STURTZ *et al.* 2012) oder auch „frozen neck“ oder „vessel depleted neck“ (HANASONO *et al.* 2009) (Abb. 1.3). Etwa 7% aller Tumorpatienten, die eine rekonstruktive

Operation in der Kopf-Hals-Region benötigen weisen einen solchen gefäßverarmten Hals auf (JACOBSON *et al.* 2008). Unter Inkaufnahme ästhetischer oder funktioneller Einbußen lassen sich in vielen Fällen durch alternative Strategien, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, noch zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. Insbesondere die knöcherne Rekonstruktion des Unterkiefers stellt in diesem Patientengut ein bisher ungelöstes Problem dar, sodass dem Wunsch des Patienten nach ästhetischer oder kaufunktioneller Rehabilitation oft nicht Folge geleistet werden kann.



Abb. 1.3: Gefäßverarmter Hals. (A und B) Klinisches Erscheinungsbild eines Patienten mit „vessel depleted neck“ nach multiplen Voroperationen und erfolgter Bestrahlung aufgrund eines Mundhöhlenkarzinoms. Für eine mikrovaskuläre Rekonstruktion des fehlenden Unterkiefers und Verschluss der intra-extraoralen Fistel submandibulär links (B) fehlen die notwendigen zervikalen Anschlussgefäße.

1.3 THERAPIEMÖGLICHKEITEN IN CHIRURGISCHEN GRENZBEREICHEN

Das hohe Indikationsspektrum, die hohe Erfolgsrate und die im Vergleich zu anderen Methoden unvergleichbar guten funktionellen und ästhetischen Ergebnisse freier Lappen lassen den rekonstruktiv tätigen Chirurgen gelegentlich vergessen, dass auch andere rekonstruktive Methoden existieren (Abb. 1.1B). In Fällen, in denen in Folge ablativer Operationen, Bestrahlungen, Verbrennungen, Traumen oder anderer Gründe die notwendigen Anschlussgefäße für einen freien Lappen fehlen, müssen alternative Rekonstruktionsmethoden gefunden werden. In vielen Fällen lässt sich durch Verwendung besonders langer Gefäßstiele (JACOBSON *et al.* 2008), alternativer Anschlussgefäße (HANASONO *et al.* 2009) oder Gefäßinterponate (MILLER *et al.* 1993) unter Inkaufnahme einer erhöhten Lappenverlustrate eine mikrovaskuläre Rekonstruktion erzielen. In anderen Fällen kann es hilfreich sein auf der Suche nach alternativen Rekonstruktionsmethoden ein, zwei Sprossen auf der rekonstruktiven Leiter (Abb. 1.1A) herabzusteigen oder auf ein konservatives Konzept mit entsprechend langer Heilungs-

phase und reduziertem funktionellen Endergebnis auszuweichen. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit sollen im Folgenden die wichtigsten Behandlungsalternativen in schwierigen rekonstruktiven Situationen in der Kopf-Hals-Region erläutert werden.

1.3.1 DIE REKONSTRUKTIVE LEITER RÜCKWÄRTS

1.3.1.1 Gestielte Muskellappen

Freie Lappen werden heute als Goldstandard für die Rekonstruktion komplexer Defekte in der Kopf-Hals-Region eingesetzt. In Situationen, in denen freie Lappen aufgrund fehlender Anschlussgefäße für den mikrovaskulären Gewebetransfer oder aus allgemeinmedizinischen Gründen nicht zur Anwendung kommen können, empfehlen sich gestielte muskulokutane Fernlappen. Diese stellen ebenfalls gesundes Gewebe aus nicht-bestrahlten Körperregionen in ausreichender Menge zur Verfügung. Zudem lassen sich solche Muskellappen in der Regel schnell und unkompliziert heben und erfordern keinen mikrovaskulären Gefäßanschluss, so dass sie aufgrund der reduzierten Operationszeiten auch in kardiopulmonal vorbelasteten Patienten eingesetzt werden können. Der Pectoralis-major-Lappen soll hier als Vertreter der gestielten muskulokutanen Fernlappen gesondert erwähnt werden, da er in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie einen wichtigen „Rettungsanker“ in schwierigen Situationen darstellt. Weitere erwähnenswerte Vertreter, auf die hier nicht genauer eingegangen werden soll, sind der gestielte Latissimus-dorsi-Lappen und der gestielte Trapeziuslappen (HAYDEN UND NAGEL 2013).

Pectoralis-major-Lappen

Im Jahre 1979 beschrieb ARIYAN den gestielten myokutanen Pectoralis-major-Lappen für Rekonstruktionen in der Kopf-Hals-Region. Der Lappen gewann schnell an Popularität und entwickelte sich zu einem „Arbeitspferd“ der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie (TEO *et al.* 2013). Der M. pectoralis major besteht aus zwei Anteilen: einer pars clavicularis, die dem mittleren Drittel der Clavicula entspringt und an der Tuberositas major des Humerus inseriert und einer pars sternalis, die vom Sternum an die oberen sechs Rippenknorpel und die Obliquus-externa-Aponeurose zieht (TEO *et al.* 2013). Die Blutversorgung erfolgt je nach gehobener Portion des Lappens über verschiedene Äste der A. thoracoacromialis oder über die A. thoracica lateralis (z.i. TEO *et al.* 2013). Zahlreiche unterschiedliche Varianten des Pectoralis-major-Lappens mit unterschiedlichem Risiko- und Einsatzspektrum wurden bisher beschrieben (TEO *et al.* 2013). Der Pectoralis-major-Lappen wird als vielfältig einsetzbar und verlässlich beschrieben und gilt als gute Alternative nach mikrovaskulärem Lappenverlust (TEO *et al.* 2013). Im Gegensatz zu freien Lappen ist die Lappenhebung einfach und erfordert keine mikrovaskulären Kenntnisse. Der Lappen bietet eine große Hautfläche, und durch den Pectoralmuskel ausreichend Volumen zur Ausformung der Halskontur und Abdeckung

der großen Halsgefäße (TEO *et al.* 2013). Die Spenderseite lässt sich in der Regel primär verschließen. Häufige Verwendung findet der Lappen in der Defektdeckung im Bereich der Mundhöhle, Oropharynx und Laryngopharynx (z.i. TEO *et al.* 2013). Auch Rippenknochen kann für Unterkieferrekonstruktionen in den Lappen integriert werden (z.i. TEO *et al.* 2013), allerdings wird dies nach Bestrahlung nicht empfohlen (FUJIOKA 2014).

Die Hauptnachteile der Verwendung gestielter Fernlappen sind wie folgt. Durch die fixierte Position und limitierte Stiellänge solcher Lappen ist die Rotationsmöglichkeit eingeschränkt und damit auch die überbrückbare Entfernung zum Defekt (SAKURABA *et al.* 2013). Maxilläre Rekonstruktionen sind daher mit dieser Methode praktisch unmöglich (SAKURABA *et al.* 2013). Ein weiterer Nachteil myokutaner Stiellappen kann die unzureichende Blutversorgung der Hautinsel sein, was zu einer hohen Komplikationsrate führt (z.i. SAKURABA *et al.* 2013). Auch können knöcherne Rekonstruktionen, wie die Wiederherstellung des Unterkiefers, zumindest im bestrahlten Kiefer, nicht durchgeführt werden. Die Komplikationsrate (partielle oder Totalnekrose, Fisteln, Dehiszenz etc.) sind höher als unter Verwendung mikrovaskulärer Transplantate, insbesondere nach erfolgter Bestrahlung (KRUSE *et al.* 2011). Vor allem die Deckung von exponiertem Knochen bei Osteoradionekrose scheint problematisch zu sein (ZBAR *et al.* 1997). Auch die Kombination aus gestieltem Lappen und Rekonstruktionsplatte führt meist nur zu einem kurzfristigen Heilungserfolg (HAYDEN UND NAGEL 2013). Als weiterer großer Nachteil gestielter Lappen ist auch das im Vergleich zu mikrovaskulären Rekonstruktionen beeinträchtigte funktionelle (Sprache und Schluckvorgang) und ästhetische Operationsergebnis zu nennen (MUCKE *et al.* 2012a; CORBITT *et al.* 2014). Gerade bei Frauen kann der Lappen aufgrund einer Verziehung der weiblichen Brust nur in Ausnahmefällen empfohlen werden (KRUSE *et al.* 2011).

1.3.1.2 Lokoregionäre Lappen

Das lokale Gewebe reicht bei Patienten mit gefäßverarmtem Hals meist nicht für eine Deckung aus (JACOBSON *et al.* 2008). Lokale Hautlappenplastiken (random pattern flaps, Abb. 1.2) werden nach erfolgter Strahlentherapie zudem nicht empfohlen, da es aufgrund der Lage des Gewebes im Strahlenfeld in der Regel zumindest zu einer Teilnekrose (FUJIOKA 2014) und damit zur Wunddehiszenz kommt. Hauttransplantate sind im bestrahlten Gebiet wegen der nahezu hundertprozentigen Verlustrate ebenfalls nicht sinnvoll (z.i. FUJIOKA 2014). Es existieren jedoch eine Reihe lokoregionärer, vorwiegend axial gestielter fasziokutaner Lappen, die auch im vorbestrahlten und voroperierten Hals im Zeitalter der Mikrochirurgie einen festen Platz haben (COLLETTI *et al.* 2012; CHAN UND CHAN 2014). Wichtigster Vertreter ist der Deltopectoralappen (CHAN UND CHAN 2014), der hier neben dem fasziokutanen Temporalislappen, dem Supraskapularlappen und dem myokutanen Platysmalappen gesondert Erwähnung finden soll. In dieser Kategorie fällt auch der myokutane Platysmalap-

pen (FUTRELL *et al.* 1978), der jedoch mit Komplikationsraten zwischen 10 und 40% gerade nach neoadjuvanter Chemotherapie (VERSCHUUR *et al.* 1998) oder Bestrahlungen (SZUDEK UND TAYLOR 2007) als unsicher gilt (z.i. SZUDEK UND TAYLOR 2007), und daher für das in dieser Arbeit thematisierte Patientengut ungeeignet ist. Andere lokoregionäre Lappen, deren Anwendung im vorbestrahlten voroperierten Patienten beschrieben wurden, sind der Wangenlappen (PEPPER UND BAKER 2013), der Zungenlappen (CERAN *et al.* 2013) der laterale Halslappen (KUMMOONA 2010), der submentale Lappen (z.i. HAYDEN UND NAGEL 2013) und der muskulomukosale A. facialis (FAMM) Lappen (z.i. HAYDEN UND NAGEL 2013).

Deltopectorallappen

Der Deltopectorallappen ist auch unter dem Namen „Bakamjian flap“ bekannt, benannt nach dem 2010 verstorbenen Pionier der plastischen Chirurgie Vahram Y. BAKAMJIAN, der die Anwendung dieses Lappens zur Rekonstruktion eines pharyngoesophagealen Defekts nach Laryngopharyngektomie beschrieb. Der auf der A. thoracica interna basierende, fasziokutane Lappen gilt als geschmeidig und formbar und stimmt in Colorit und Textur hervorragend mit der Haut in der Kopf-Hals-Region überein (CHAN UND CHAN 2014). Im Gegensatz zu dem weiter unten beschriebenen Temporalislappen liegt die Entnahmestelle nicht im Gesicht, sondern auf der Schulter (HAYDEN UND NAGEL 2013) und damit in der Regel außerhalb des Strahlenfensters, in einem ästhetisch günstigeren Bereich. Zahlreiche Variationen zur Hebung des Deltopectorallappens wurden in den letzten Jahrzehnten beschrieben, wodurch die Vielseitigkeit des Lappens erhöht wurde. Der Deltopectorallappen ist für Rekonstruktionen des unteren Gesichts, der Mundhöhlenmukosa, zur Rekonstruktion durchgehender Wangendefekte sowie des Halses geeignet und kann für komplexere Situationen mit dem Pectoralis-major-Lappen kombiniert werden (CHAN UND CHAN 2014). Das durch die Lappenhebung entstehende funktionelle Defizit ist minimal (CHAN UND CHAN 2014), allerdings lässt sich die Spenderregion nicht primär verschließen, sondern erfordert in der Regel eine Deckung mit Hauttransplantaten (CHAN UND CHAN 2014). Der Lappen galt lange als „Arbeitspferd“ der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie, bis er durch moderne mikrochirurgische Techniken verdrängt wurde (CHAN UND CHAN 2014). Seine heutige Aufgabe ist eher die eines „Rettungsankers“, also einer Reservemethode in Fällen, in denen keine mikrochirurgische Lappen angewendet werden können. KRIJGH UND MUREAU (2013) beschreiben die erfolgreiche Anwendung des Deltopectorallappens in drei Patientenfällen, bei denen aufgrund von Voroperationen und Bestrahlung kein freier Lappen verwendet werden konnte. Die Autoren beschreiben den Deltopectorallappen als sicheren, verlässlichen und einfach zu hebenden Lappen, der auch in der heutigen Zeit in der Behandlung komplexer rekonstruktiver Herausforderungen einen Stellenwert habe (KRIJGH UND MUREAU 2013).

Temporalislappen

Der Temporalislappen wurde 1963 von MCGREGOR für die Rekonstruktion der Mundhöhle nach Resektion von Mundhöhlenkarzinomen beschrieben. Die vaskuläre Versorgung des fasziokutanen Lappens basiert auf der A. temporalis superficialis. Der Lappen kann als gestielter oder als Insellappen gehoben werden (z.i. COLLETTI *et al.* 2012). Vorteile des Lappens sind die relativ lange Stiellänge und die Möglichkeit, den Lappen als „composite flap“ zu heben (COLLETTI *et al.* 2012). Der Lappen gilt als vielseitig und ermöglicht Rekonstruktionen im Bereich von Skalp, Stirn, Obergesicht, Mundwinkel und Mundhöhle. COLLETTI *et al.* (2012) beschreiben die Verwendung eines prälaminierten, autonomisierten fasziokutanen Temporalislappens zur Rekonstruktion eines ausgedehnten durchgehenden Wangendefekts nach vorangegangenem Verlust eines mikrovaskulären Transplantats. Die Autoren empfehlen lokoregionäre Lappen als Rekonstruktionsmethode nach teilweiser oder vollständiger Nekrose eines mikrovaskulären Lappens und als Salvage Methode, wenn mikrovaskuläre Lappen kontraindiziert sind (COLLETTI *et al.* 2012). Die verzögerte Technik der Lappenhebung erhöht die Sicherheit des Lappens und ermöglicht die Prälaminierung der Lappenunterfläche, wodurch durchgängige Defekte rekonstruiert werden können (COLLETTI *et al.* 2012). Die erhöhte Sicherheit geht jedoch auf Kosten einer verlängerten Hospitalisierung und der Notwendigkeit eines dreistufigen Operationskonzepts (COLLETTI *et al.* 2012). Während das funktionelle Resultat des Temporalislappens akzeptabel ist (COLLETTI *et al.* 2012), muss die Lage der Spenderregion im Gesicht als nachteilig gewertet werden. Narben im Gesicht und eine ästhetisch störende Einsenkung in der Schläfenregion sind die Folge. Weitere typische Komplikationen dieses Lappens sind Alopezie und Verletzung des Stirnastes des N. facialis mit Ptosis der Augenbraue (z.i. COLLETTI *et al.* 2012). Bedingt durch den anatomischen Verlauf der A. temporalis besteht zudem beim Umschlagen des Lappens in kaudal gelegene Defektregionen das Risiko den Gefäßstiel abzuknicken (*engl.* „kinking“) (SHIMIZU *et al.* 2009).

Supraclavicularlappen

Der fasziokutane Supraclavicularlappen oder Trapezius-Deltoideus-Lappen wurde erstmals 1979 von LAMBERTY beschrieben. Die axiale Gefäßversorgung des Lappens basiert auf der A. supraclavicularis, einem Abgang der A. transversa colli (COLLETTI *et al.* 2012). Der Lappen bedient sich der Haut der supraclaviculären Region und Schulter und kann in Größendimensionen von bis zu 25 x 10 cm ohne die Gefahr einer Spitzennekrose gehoben werden (HAYDEN UND NAGEL 2013). Er lässt sich als gestielter Lappen, Insellappen oder frei heben (COLLETTI *et al.* 2012). Indiziert ist der Supraclavicularlappen zur Defektdeckung des Halses, des unteren Gesichtsdrittels (CHIU *et al.* 2009), des Okziputs, der Mundhöhle und des Pharynx (HAYDEN UND NAGEL 2013). Der Supraclavicularlappen gilt als sicher, technisch einfach und schnell zu heben, verfügt über eine sensible Innervation und weist eine geringe Hebe-

morbidität auf (HAYDEN UND NAGEL 2013). Die Spenderregion lässt sich nach Entnahme von Lappen mit einer Breite von bis zu 10 cm primär verschließen (COLLETTI *et al.* 2012). Colorit und Textur des Lappens sind mit der Gesichtshaut vergleichbar (SANDU *et al.* 2012). Als nachteilig hingegen gelten der kurze Gefäßstiel (1–7 cm) und die anatomische Variabilität der A. supraclavicularis (LIU UND CHIU 2009). COLLETTI *et al.* (2012) beschreiben die erfolgreiche Verwendung prälaminiertes Supraclavicularlappen zur Deckung zervikaler und paramandibulärer Defekte in drei Fällen nach Verlust des mikrovaskulären Lappens. Auch im gefäßverarmten Hals hat sich der Lappen als wertvolle Alternative bewiesen (SU *et al.* 2013). Problematisch ist die Verwendung des Supraclavicularlappens allerdings nach Lymphknotenausräumung in Level V im Rahmen einer Neck Dissection (HAYDEN UND NAGEL 2013).

Hauptnachteile lokoregionärer Lappen im Allgemeinen sind das fehlende Volumen und die damit fehlende Möglichkeit tiefe mehrschichtige Defekte adäquat zu versorgen. Die Überbrückung knöcherner Defekte ist mit fasziokutanen Lappen allein nicht zu erzielen. Die Abdeckung einer Rekonstruktionsplatte nach Unterkiefer(teil)resektion ist aufgrund des fehlenden weichgewebigen Polsters ebenfalls nicht sinnvoll.

1.3.1.3 Alternative chirurgische Techniken

Gewebeexpansion

Unter Gewebeexpansion versteht man die Dehnung von lokalem Gewebe durch subkutanes Einbringen eines Expanders, dessen Volumen über einen Zeitraum von mehrere Wochen zunehmend erhöht wird. Expandierte Haut liefert gut perfundiertes Gewebe (FUJIOKA 2014) und wird von einigen Autoren für die Versorgung von Strahlenulcera verwendet (z.i. FUJIOKA 2014). Weitere Vorteile dieses Ansatzes sind die Vermeidung ausgedehnter operativer Eingriffe und die fehlenden funktionellen Einschränkungen nach Lappenhebung (FUJIOKA 2014). Anatomisch bedingt sind die Einsatzmöglichkeiten in der Kopf-Hals-Region limitiert, die Gewebeexpansion könnte jedoch in Kombination mit anderen Techniken, z.B. lokoregionären Lappen aus der Schulter-/ Brustregion eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

Sekundärheilung und unterstützende VAC-Therapie

Auf dem Weg die rekonstruktive Leiter hinab sind wir nun wieder am Boden angekommen (Abb. 1.1A). Scheitern alle rekonstruktiven Maßnahmen bleibt häufig als letzte Alternative die freie Wundgranulation. Unter erheblichem Zeitaufwand lassen sich unter kontinuierlicher Spülung und Säuberung der Wunde auf diese Weise auch größere Defekte verschließen oder zumindest „stabile Wundverhältnisse“ erzielen. Die sekundäre Wundheilung ist zeitaufwändig, aufgrund der offenen Wundsituation belastend für den Patienten und anfällig für Komplikationen (Infektionen). Sie führt zu unsicheren Ergebnissen und ist selbst bei optima-

lem Verlauf mit ausgeprägten Vernarbungen und einem entsprechend schlechten funktionellen und ästhetischen Endergebnis verbunden.

Eine zunehmend an Popularität gewinnende Methode, mit deren Hilfe akute und chronische Wunden letztendlich über eine Induktion der sekundären Wundheilung behandelt werden können, ist die Vacuum-Therapie oder kurz V.A.C.[®]-Therapy (*engl.* „vacuum assisted closure“). Nachdem diese Therapieform lange Zeit aufgrund der Nähe zu den großen Gefäßen in der Kopf-Hals-Region kontraindiziert war, weitete sich die Indikationsstellung in den letzten Jahren deutlich aus (PALM *et al.* 2011). Das Prinzip dieser Therapieform besteht darin, dass die normalerweise eng umschriebene Sogwirkung einer Drainage über einen offenporigen, der Wundkontur angepassten Schwamm gleichmäßig auf die gesamte Wundoberfläche verteilt wird (PALM *et al.* 2011). Dadurch lassen sich eine Verkleinerung der Wunde durch Annäherung der Wundränder (Wundkontraktion), eine Förderung der Wundgranulation und eine kontinuierliche Reinigung der Wunde erzielen (PALM *et al.* 2011). Die V.A.C.[®]-Therapy darf aufgrund des erheblichen Blutungsrisikos nicht in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen (*cave*: vorbestrahlte Halsgefäße) angewendet werden und ist bei „maligner Tumorstunde“ kontraindiziert (Herstellerangaben, Kinetics Concepts Inc. (KCI), San Antonio, TX, United States), wodurch die Anwendbarkeit der Methode, zumindest vor dem Kontext des in dieser Arbeit thematisierten, vorbestrahlten Tumorstunden, stark eingeschränkt wird.

Tissue-Engineering

Trotz enormer Fortschritte auf dem Gebiet der Gewebezüchtung in den letzten Jahrzehnten hat diese Technik vorwiegend experimentellen Charakter (CHANG *et al.* 2009). Der Transfer großer mehrschichtiger Gewebeblöcke in ein kompromittiertes Wundbett ist durch Tissue-Engineering heute noch nicht möglich. Insbesondere in dem hier dargestellten Kontext des „vessel depleted neck“ sind präformierte Zellkonstrukte ungeeignet.

1.3.2 MIKROCHIRURGISCHE OPTIONEN TROTZ FEHLENDER LOKALER GEFÄßE

Auch wenn das Arsenal rekonstruktiver Methoden selbst in schwierigen Situationen mit Alternativen aufwarten kann, sind diese doch mit teils erheblichen Nachteilen wie langwierigem Heilungsverlauf und hohen Komplikationsraten v.a. nach Bestrahlung verbunden. Zudem führen diese Reservemethoden in der Regel zu deutlich schlechteren funktionellen und ästhetischen Ergebnissen. Spätestens, wenn es um die komplexe knöcherne und weichgewebige Wiederherstellung langstreckiger Unterkieferdefekte geht, fehlen sinnvolle Alternativen zur mikrovaskulären Lappenchirurgie. Es lohnt sich also in solchen Fällen nicht nur die Suche nach alternativen Therapiestrategien, sondern auch nach alternativen Anschlussgefäßen, an die möglicherweise doch noch ein mikrovaskuläres Transplantat angeschlossen werden kann. Im Folgenden sind wichtige Strategien zum Auffinden alternativer Gefäße und operative Tricks aufgeführt, die selbst in scheinbar aussichtslosen Fällen noch einen mikrovaskulären Lappentransfer ermöglichen sollen.

1.3.2.1 Wahl des Lappens

Die Vielzahl der heute beschriebenen freien Lappen bietet für jeden Kopf-Hals-Defekt in der Regel mehrere mögliche Optionen mit vergleichbaren ästhetischen und funktionellen Ergebnissen. Durch Wahl eines Lappens mit entsprechend langem Gefäßstiel kann versucht werden, die Gefäße der kontralateralen Halsseite oder andere alternative Anschlussgefäße zu erreichen (HEAD *et al.* 2002; WONG *et al.* 2010).

1.3.2.2 Alternative Anschlussgefäße

Für den arteriellen Gefäßanschluss werden in der Regel Abgänge der A. carotis externa wie die A. thyroidea superior und A. facialis verwendet (HANASONO *et al.* 2009). Für den venösen Anschluss eignen sich Abgänge der V. jugularis interna oder die V. jugularis externa (WONG *et al.* 2010). Fehlen alle typischen Anschlussgefäße in der Kopf-Hals-Region einer Seite traumatisch, resektionsbedingt oder in Folge von Bestrahlungen, so kann auf eine Reihe von Reservegefäßen ausgewichen werden. Abbildung 1.4 stellt typische und Reserveanschlussgefäße im Bereich des Halses dar.

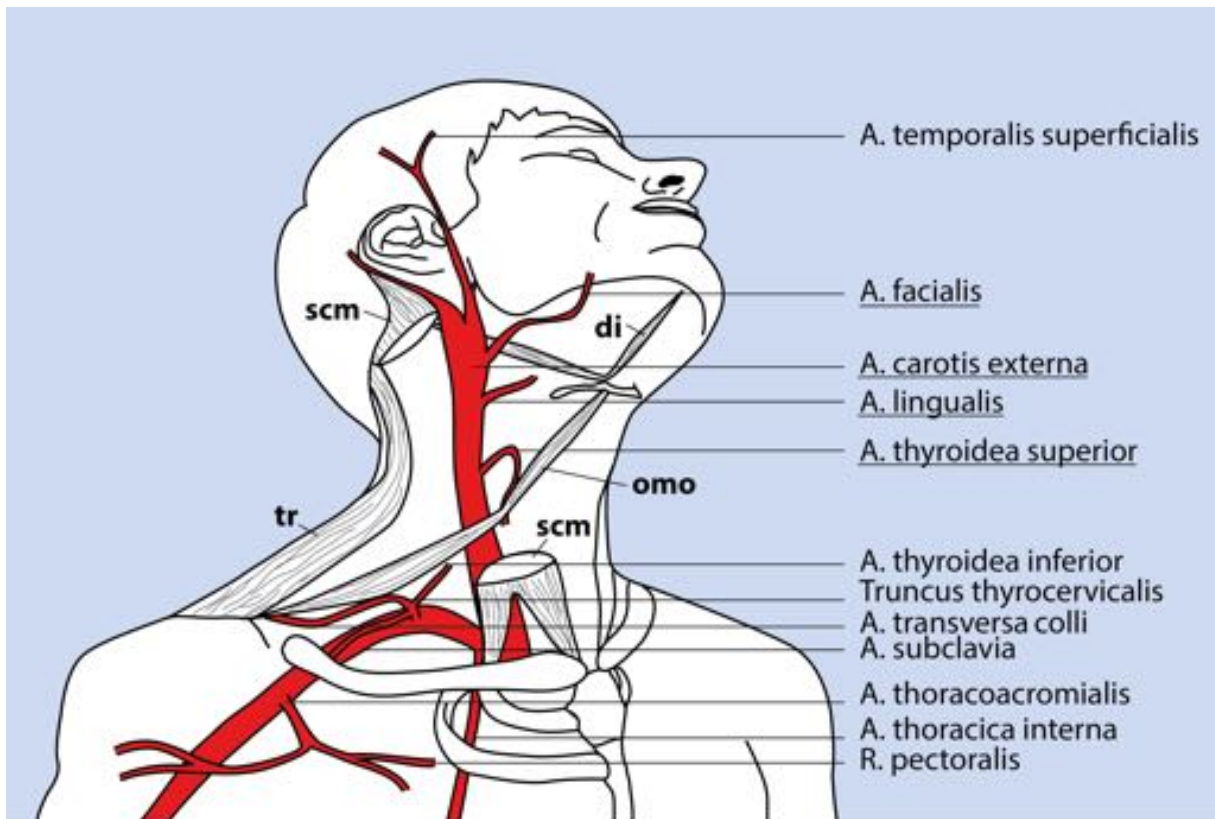


Abb. 1.4: Anschlussgefäße in der Kopf-Hals-Region. Die gebräuchlichsten Arterien für den mikrochirurgischen Gefäßanschluss sind große Abgänge der A. carotis externa wie die A. thyroidea superior oder A. facialis und gelegentlich die A. lingualis (unterstrichen). Fehlen diese Gefäße, so kommen als zweite Wahl unter anderem die A. transversa colli oder A. thoracica interna (= A. mammaria interna) in Betracht. Wichtige Muskeln des Halses sind schraffiert dargestellt: scm= M. sternocleidomastoideus, durchtrennt. tr= M. trapezius. omo= M. omohyoideus. di= M. digastricus.

HANASONO *et al.* (2009) beschreiben einen Algorithmus zum Auffinden von Anschlussgefäßen für den mikrovaskulären Gefäßanschluss zur Rekonstruktion von Kopf-Hals-Defekten (Abb. 1.5). Bei Fehlen aller typischen Anschlussgefäße einer Halsseite empfehlen die Autoren auf die kontralaterale Halsseite auszuweichen, sofern hierzu kein Interponat notwendig ist. Alternativ bieten sich die transversen Halsgefäße (A. und V. transversa colli) an. Lässt sich auch auf diese Weise kein Gefäßanschluss erzielen, werden Veneninterponate zur Überbrückung der Distanz zwischen Defekt und einem fernen Anschlussgefäß (z.B. auf der contralateralen Halsseite) empfohlen. Für den venösen Anschluss bietet sich zudem die V. cephalica an. Wird mehr als ein Lappen transplantiert, kann der Gefäßstiel eines Lappens als Anschluss für den zweiten Lappen verwendet werden. Dies macht jedoch nur Sinn wenn zumindest für einen Lappen adäquate Anschlussgefäße vorliegen. Erst wenn auch auf diese Weise kein freier Lappentransfer möglich ist, werden alternative Anschlussgefäße wie die A. thoracica interna empfohlen (HANASONO *et al.* 2009). Im Folgenden sollen die Vor- und Nachteile der einzelnen aufgeführten Gefäße und weitere Alternativen diskutiert werden.

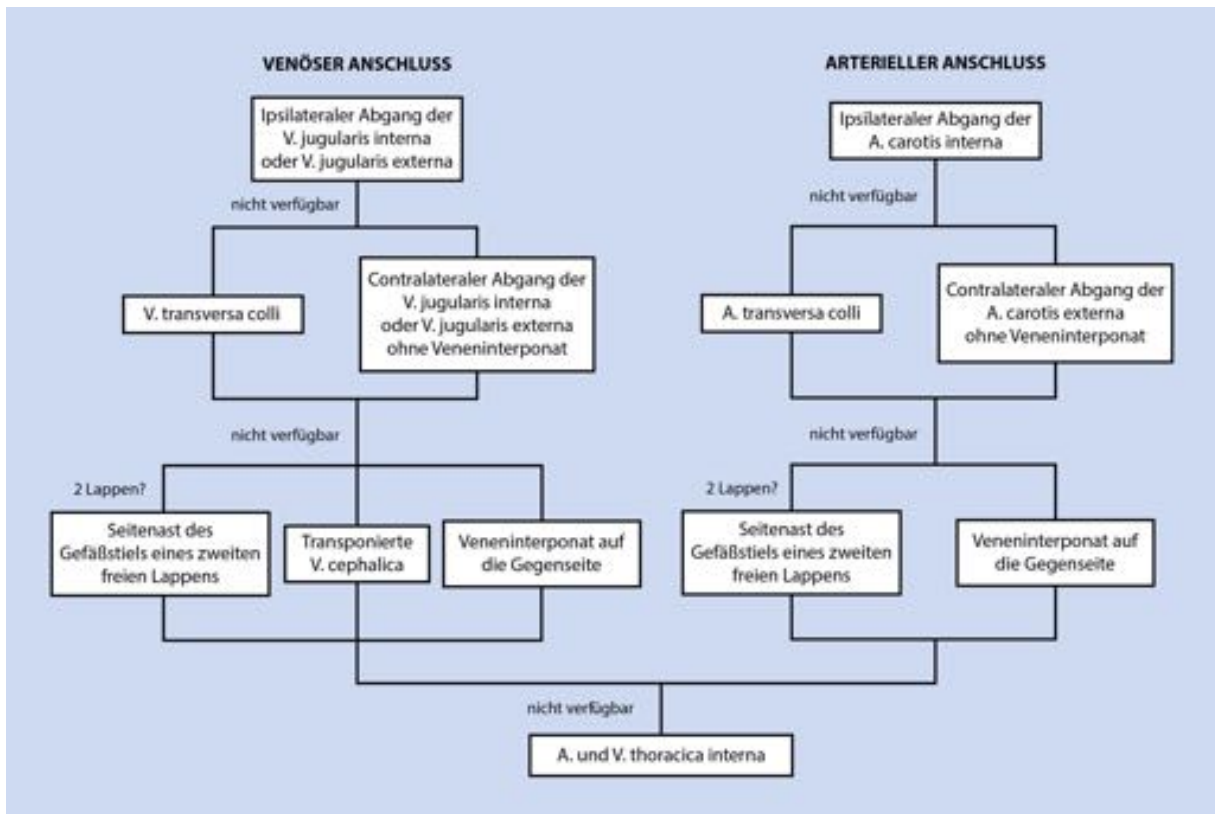


Abb. 1.5: Algorithmus zur Lokalisation möglicher Anschlussgefäße. Algorithmus zur Auffindung möglicher Anschlussgefäße für den mikrovaskulären Gefäßanschluss in der Kopf-Hals-Region. Modifiziert nach HANASONO *et al.* (2009).

Defektnahe Gefäße

Gefäße der Gegenseite

Finden sich auf der ipsilateralen Halsseite keine Anschlussgefäße für einen freien Lappen-transfer empfehlen HANASONO *et al.* (2009) auf die Gegenseite auszuweichen. In der Regel sind Lappen mit langem Gefäßstiel oder Veneninterponate notwendig, um die Distanz zwischen Defekt und kontralateraler Halsseite zu überbrücken. Wurde auf beiden Halsseiten operiert, finden sich möglicherweise auch auf der kontralateralen Halsseite keine adäquaten Gefäße mehr. Die Überquerung der Medianlinie des Halses unter vernarbtem Integument kann zudem zur Kompression des Lappenstiels führen (GIEßLER 2013).

Gefäßstiel eines zweiten mikrovaskulären Lappens

Wird mehr als ein Lappen für die Defektrekonstruktion verwendet, können Anschlussgefäße eingespart werden, indem die Stielgefäße eines Lappens als Gefäßanschluss für einen zweiten Lappen herangezogen werden (HANASONO *et al.* 2009). Dies kann entweder End-zu-End über einen größeren Gefäßabgang der Lappenarterie oder End-zu-Seit an die Lappenarterie selbst erfolgen (analog für die Vene). Alternativ können zwei (oder mehr) Lappen auch in Serie geschaltet werden, das heißt der zweite Lappen wird an das distale Ende der versorgenden Arterie des ersten Lappens anastomosiert. Auf diese Weise können zwar An-

schlussgefäße eingespart werden, dennoch ist zumindest für den ersten Lappen ein entsprechender Gefäßanschluss notwendig. Auf dieses als „Durchflusslappen“ bekannte Prinzip wird weiter unten detailliert eingegangen. Wurde bereits in einer früheren Operation ein mikrovaskulärer Lappen eingebracht, kann der Gefäßstiel dieses Lappens theoretisch ebenfalls als Gefäßanschluss für einen neuen freien Lappen dienen. WOLFF *et al.* (2009) stellten fest, dass selbst große „composite-flaps“ nach 18 Tagen autonom von dem versorgenden Gefäßstiel sind. Daher ist theoretisch selbst ein End-zu-End Anschluss an den Gefäßstiel eines bereits eingeeilten, autonomisierten Lappens denkbar – vorausgesetzt dieser weist noch einen ausreichenden Fluss auf.

Kleine unübliche Gefäße

Auch über kleine, eher selten gebräuchliche Anschlussgefäße, wie die A. angularis, die A. facialis mit enoralem Zugang oder die A. occipitalis major lassen sich, gerade im zentralen Gesichtsbereich, auch komplexe maxilläre oder naso-orbito-ethmoidale Rekonstruktionen realisieren (GIEßLER 2013). Diese Gefäße sind aufgrund der geringen Förderrate und des kleinen Kalibers allerdings in erster Linie für kleinvolumige Lappenplastiken geeignet (GIEßLER 2013). Für die Präparation der Gefäße muss im Einzelfall supramikrochirurgisches Spezialbesteck verwendet werden und bereits zur Gefäßdarstellung ist die Verwendung einer Lupenbrille oder eines OP-Mikroskops unverzichtbar (GIEßLER 2013).

Entfernte Gefäße

Wurden die Äste der A. carotis externa bereits geopfert, kann die Suche nach einem adäquaten arteriellen Gefäßanschluss für den mikrovaskulären Lappentransfer problematisch werden. Als Reservegefäße können in erster Linie die querverlaufenden Halsgefäße (A. und V. transversa colli) empfohlen werden (JACOBSON *et al.* 2008; HANASONO *et al.* 2009).

Arteria transversa colli

Die A. transversa colli entspringt in der Regel dem Truncus thyrocervicalis (77%), seltener aus der A. subclavia oder A. thoracica interna (JACOBSON *et al.* 2008) und fehlt in 6% aller Fälle auf der ipsilateralen Seite vollständig (z.i. HANASONO *et al.* 2009). Die zugehörige Vene drainiert in die V. jugularis externa oder V. subclavia (WONG *et al.* 2010) und ist in etwa 12% nicht angelegt (z.i. HANASONO *et al.* 2009). Aufgrund der kaudalen Lage der Gefäße sind häufig Veneninterponate notwendig. Zwar kann der Gefäßstiel durch Präparation der Gefäße nach lateral etwas verlängert werden, dieser Zugewinn gelingt jedoch auf Kosten des Gefäßkalibers (JACOBSON *et al.* 2008; WONG *et al.* 2010). Praktisch alle Tumorpatienten mit gefäßverarmtem Hals wurden im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte in der Halsregion bestrahlt (100% in einem großen Kollektiv von insgesamt 197 Tumorpatienten, JACOBSON *et al.* 2008). Als weiterer Nachteil der transversalen Halsgefäße muss daher deren Lage im Strahlenfeld

gewertet werden, zumal bekannt ist, dass der mikrovaskuläre Gefäßanschluss an bestrahlten Gefäßen komplikationsträchtig ist (JACOBSON *et al.* 2008). HANASONO *et al.* (2009) empfehlen die Transversa-colli-Gefäße dennoch als Reservegefäße erster Wahl, wenn die bevorzugten Abgänge der A. carotis externa nicht mehr zur Verfügung stehen (Abb. 1.5).

Arteria temporalis superficialis

Die A. temporalis superficialis stammt aus der A. carotis externa und zieht präaurikulär in Richtung Skalp (Abb. 1.4). Sie liegt zwischen der temporalen und temporoparietalen Faszie. In ca. 15% fehlt die Vene (HANSEN *et al.* 2007). Das Kaliber der Arterie liegt zwischen 1,8 und 2,7 mm. Die Vene ist mit 2,1 bis 3,3 mm etwas kaliberstärker (z.i. WONG *et al.* 2010), kann jedoch fehlen und ist relativ fragil, weshalb für die Präparation eine Lupenbrille dringend empfohlen wird (GIEßLER 2013). SHIMIZU *et al.* (2009) beschreiben die A. temporalis als Reserveanschlussgefäß in gefäßverarmten Hälsen. Die Nachteile liegen in einem möglicherweise sehr kleinen Kaliber, dem potenziell fehlenden venösen Anschluss (HANSEN *et al.* 2007), der dünnen, verletzungsanfälligen Gefäßwand (SHIMIZU *et al.* 2009) und der ungünstigen Gefäßgeometrie, die bei nach kaudal gerichtetem Gefäßanschluss zur Abknickung neigt (SHIMIZU *et al.* 2009). Auch ist die mögliche Gefäßstiellänge limitiert, weshalb sich die Rekonstruktionsmöglichkeiten auf den Sklap und die oberen zwei Drittel des Gesichts beschränken (z.i. WONG *et al.* 2010).

Arteria thoracoacromiales/ zephalikales System

Die A. thoracoacromialis entstammt der A. axillaris und teilt sich in die vier separaten Äste R. pectoralis, R. clavicularis, R. deltoideus und R. acromialis (z.i. WONG *et al.* 2010, Abb. 1.4). HARRIS *et al.* (2002) beschreiben eine Serie von elf erfolgreichen Fällen, in denen das thoraokoakromiale Gefäßsystem als Anschlussgefäß für mikrovaskuläre Lappen verwendet wurde. Die Autoren resumieren, dass diese Gefäße eine zuverlässige Methode seien, wenn keine anderen Anschlussgefäße aufgefunden werden können. Während die A. thoracoacromialis als Stammgefäß mit einem Durchmesser von 1,2 bis 2,4 mm in der Regel eine gute Größenkohärenz zum Anschlussgefäß aufweist, liegt der Gefäßdurchmesser der einzelnen Äste oft unter 1 mm. Entsprechend anspruchsvoll gestaltet sich die mikrovaskuläre Anastomose. Häufig lässt sich ein Kalibersprung zum Anschlussgefäß nicht vermeiden (JACOBSON *et al.* 2008). Der R. pectoralis ist das versorgende Gefäß des myokutanen Pectoralis-major-Lappens. Werden A. thoracoacromialis oder R. pectoralis als Anschlussgefäß verwendet, vergibt man sich damit diesen wichtigen „Rettungsanker“ für spätere Rekonstruktionen. Aufgrund der tiefen Lage der Gefäße werden zudem Lappen mit sehr langem Gefäßstiel oder Veneninterponate für Rekonstruktionen in der Kopf-Hals-Region benötigt.

Arteria thoracica interna

In seltenen Fällen, in denen sowohl die querverlaufenden Halsgefäße als auch das thora-coacromiale System nicht mehr zur Verfügung stehen, kann die A. thoracica interna für den Gefäßanschluss herangezogen werden. Die A. thoracica interna (im englischen Sprachgebrauch A. mammaria interna) stammt aus der A. subclavia, während die V. thoracica interna in die V. brachiocephalica drainiert (WONG *et al.* 2010). Die Gefäße verlaufen parasternal an der Unterseite der oberen sechs Rippen (Abb. 1.4). Aufgrund der Lage unter dem Sternum, bzw. den Rippen ist die Gefäßpräparation anspruchsvoll (WONG *et al.* 2010). Während die A. thoracica interna in der Herzchirurgie ein beliebtes Spendergefäß als Bypass ist (NICOLINI *et al.* 2014) und häufig als Anschlussgefäß in der Brustrekonstruktion verwendet wird (z.i. JACOBSON *et al.* 2008), sind Berichte über die Verwendung in der Kopf-Hals-Chirurgie spärlich (STURTZ *et al.* 2012). STURTZ *et al.* (2012) beschreiben eine Fallserie von zwölf erfolgreichen mikrovaskulären Lappenverpflanzungen in elf Patienten mit gefäßverarmten Hals, bei denen die A. thoracica interna als Anschlussgefäß diente. Durch die Atmung des Patienten ist die Gefäßanastomose erschwert (NINKOVIC *et al.* 1995). Defekte im Bereich des mittleren und unteren Halsdrittels lassen sich auch mit einem an der A. thoracica interna gestielten Perforanslappen ohne die Notwendigkeit einer Gefäßanastomose decken (PIRGOUSIS UND FERNANDES 2011). Unabhängig von der Lappenart (frei oder gestielt) birgt die Verwendung der A. thoracica interna schwerwiegenden Risiken wie iatrogenen Pneumothorax, Intercostalnerveuralgie, Brustwanddeformitäten und Brustwandhernie (WONG *et al.* 2010; STURTZ *et al.* 2012) und erfordert zumindest die Resektion eines Rippenknochens für die Gefäßmobilisation (NINKOVIC *et al.* 1995). Neben der mühsamen Venenpräparation (NINKOVIC *et al.* 1995) und der wegfallenden Verwendungsmöglichkeit als koronaren Bypass (JACOBSON *et al.* 2008) sind der kurze Gefäßstiel, der lange subkutane Verlauf mit entsprechender Kompressionsgefahr und die zeitaufwändige Präparation weitere Nachteile dieser Gefäße. Aufgrund der kaudalen Lage ist für entfernte Defekte zudem die Verwendung eines Veneninterponats unverzichtbar. HANASONO *et al.* (2009) verwenden die Thoracica-interna-Gefäße daher nur in letzter Instanz, wenn auf beiden Halsseiten weder A. carotis externa Abgänge noch die querverlaufenden Halsgefäße zugänglich sind (Abb. 1.5).

Arteria carotis communis und A. carotis interna

Auch ein End-zu-Seit Anschluss direkt an die A. carotis communis oder interna (!) ist prinzipiell möglich. SALGARELLO *et al.* (2011) beschreiben die Verpflanzung eines vertikalen Rectus-abdominis-Muskellappens (VRAM) bei einer Patientin mit gefäßverarmten Hals direkt an die A. carotis interna mit Hilfe eines sog. Pruitt-Ianahara Carotis-Shunts. Mit dessen Hilfe lasse sich die zerebrale Sauerstoffversorgung während einer Gefäßanastomose an die A. carotis interna sicherstellen, indem ein Kurzschluss zwischen distaler A. carotis communis und

proximaler A. carotis interna hergestellt wird (SALGARELLO *et al.* 2011). Die Ischämiezeit lag bei etwa zwei Minuten. Auch wenn diese Methode im Einzelfall erfolgreich eingesetzt wurde, disqualifiziert sich die Technik aufgrund der erheblichen Gefahr einer zerebralen Ischämie für den klinischen Routineeinsatz.

Venöse Möglichkeiten

Wie oben beschrieben sind die normalerweise für den venösen Gefäßanschluss in der Kopf-Hals-Region genutzten venösen Systeme die V. jugularis interna und externa. Sind diese Gefäße auf der ipsilateralen Seite nicht mehr vorhanden oder für den Gefäßanschluss ungeeignet, müssen Alternativen gefunden werden. Bei ausreichender Gefäßstiellänge kann die kontralaterale Halsseite für den Anschluss herangezogen werden (WONG *et al.* 2010). Fehlen auch hier geeignete Anschlussgefäße, können zwar Veneninterponate (siehe Seite 23) angewendet werden, aber aufgrund der doppelten Anzahl notwendiger Anastomosen erhöht sich dadurch jedoch das Risiko eines Lappenverlusts (z.i. SALGARELLO *et al.* 2011, MILLER *et al.* 1993; BOZIKOV UND ARNEZ 2006, z.i. WONG *et al.* 2010). Darüber hinaus erfordert ein solcher Eingriff eine hohe mikrovaskuläre Expertise und kann nur unter erhöhtem Zeitaufwand erfolgen.

Transposition der Vena cephalica

Eine alternative Methode stellt die Transposition der V. cephalica dar (JACOBSON *et al.* 2008; HANASONO *et al.* 2009; VASILAKIS *et al.* 2009; QUILICHINI *et al.* 2012). Die V. cephalica zieht von der Dorsalseite des Daumens entlang der radialen Beugersehne des Unterarms in Richtung Ellenbeuge. Im weiteren Verlauf nach kranial verläuft die Vene am lateralen Rand des M. biceps brachii entlang und mündet zwischen M. pectoralis major und M. deltoideus in der Mohrenheimschen Grube (Trigonum clavipectorale) in die V. axillaris (z.i. WONG *et al.* 2010, JACOBSON *et al.* 2008). Die Vene kann entlang des Armes nach kranial freigelegt und nach oben geschlagen werden und auf diese Weise als Anschlussvene dienen. Die großen Vorteile dieses Anschlussgefäßes sind das große Kaliber und die Stiellänge (JACOBSON *et al.* 2008; WONG *et al.* 2010) sowie die Lage außerhalb des Strahlenfeldes. Auch genügt im Vergleich zu Veneninterponaten eine Gefäßanastomose (HANASONO *et al.* 2009). Die Nachteile liegen in der langen Schnitfführung am Arm und der im Vergleich zu Venen der unteren Extremitäten relativ dünnen Gefäßwand. Durch den ungünstigen anatomischen Verlauf und die lange subkutane Streckenführung wird zudem eine Gefäßkompressionen oder -abknickung begünstigt (z.i. JACOBSON *et al.* 2008; WONG *et al.* 2010).

1.3.2.3 Operationstechnische Methoden

Veneninterponate

Liegen Defekt- und Anastomoseregion so weit auseinander, dass die Gefäßstiellänge nicht ausreicht um die Distanz zu überbrücken, bieten sich langstreckige Veneninterponate an, die zwischen Spender- und Empfängerarterie bzw. -vene anastomosiert werden (MILLER *et al.* 1993). Als Veneninterponat werden typischerweise die V. saphena (CHANG *et al.* 2007) oder die V. cephalica (z.i. WONG *et al.* 2010) herangezogen. ACLAND (1990) fordert, die Anwendung solcher Veneninterponate sorgfältig zu planen und eine Reihe technischer Details zu beachten, da die gehobene Vene als neuer Lappenstil dienen soll. Dennoch führt die Verwendung von Interponaten zu einem fast 4-fach erhöhten Risiko für Lappenverlust (z.i. SALGARELLO *et al.* 2011, MILLER *et al.* 1993; BOZIKOV UND ARNEZ 2006, z.i. WONG *et al.* 2010). Als weiterer Nachteil von Veneninterponaten ist die zusätzliche Hebemorbidity zu nennen.

Arteriovenöse Loops

Temporäre arteriovenöse Gefäß-„Loops“ (*dt.* Schlingen) bzw. „Shunts“ (*dt.* Fisteln oder Kurzschlüsse) stellen eine alternative Methode zur Einbringung solcher Veneninterponate dar. Dazu wird eine lange Vene gehoben und je ein Ende der Vene an Arterie bzw. Vene des Transplantats anastomosiert. In einem zweiten Schritt wird der nun in einer Gefäßschlinge blind endende (*engl.* „blind loop“) Gefäßstil durch einen subkutanen Tunnel in die Anastomoseregion gezogen, die Schlinge durchtrennt und die beiden dadurch neu entstandenen Gefäßstümpfe mit Arterie und Vene der Spenderregion anastomosiert. Zwar erfordert diese Technik analog zu konventionellen Veneninterponaten die doppelte Anzahl an Gefäßanastomosen, ein Teil der Anastomosen kann jedoch *ex vivo* durch ein zweites Operationsteam erfolgen, weshalb diese Methode von manchen Autoren auch als extrakorporaler Loop bezeichnet wird (TOPALAN *et al.* 2002). Eine ähnliche Methode, die zur Generierung eines Gefäßanschlusses im gefäßverarmten Hals beschrieben wurde, ist der Corlett loop (ETHUNANDAN *et al.* 2007). Bei dieser Methode wird die kaudal abgesetzte, nach oben geschlagene V. cephalica zunächst an einen Ast der A. carotis externa der kontralateralen Seite anastomosiert. Die Vene wird anschließend geteilt und das mit der A. carotis externa verbundene Segment mit der Lappenarterie anastomosiert. Das andere, in die V. axillaris drainierende Segment der Vene wird an die Lappenvene anastomosiert und dient als venöser Abfluss. ETHUNANDAN *et al.* (2007) gelang auf diese Weise in einem Einzelfall die Rekonstruktion eines Unterkieferdefekts im gefäßverarmten Hals mit einem mikrovaskulären Fibulatransplantat. Aufgrund der höheren Anzahl der Anastomosen ist jedoch bei der Verwendung von Loops, analog zu konventionell eingebrachten Veneninterponaten, von einem erhöhten Risiko für Lappenverlust auszugehen. Dieser Sachverhalt könnte durch mechanische

Okklusion durch die subkutane Führung der Gefäße möglicherweise zusätzlich negativ beeinflusst werden.

Mega-flap

Für komplexe Defekte mit großem Weichteil und Knochendefizit wurde der sog. „Mega-flap“ beschrieben (AVIV *et al.* 1991). Darunter versteht man einen kombinierten Skapula und Latissimuslappen. Beide Lappen können, gestielt an der A. subscapularis als gemeinsames Anschlussgefäß als Doppellappen gehoben werden. KARLE *et al.* (2013) beschreiben die erfolgreiche Verpflanzung solcher „Mega-flaps“ in drei Patienten mit gefäßverarmtem vorbestrahltem Hals und gravierenden Wundheilungsstörungen. Der Anschluss erfolgte über Veneninterponate an A. und V. thoracica interna.

Verlängerung des Gefäßstiels

JACOBSON *et al.* (2008) beschreiben eine Technik, durch die eine Verlängerung der Gefäßstiellänge eines existierenden osteokutanen Lappenmodells (Skapulalappen) erreicht werden kann. Diese Modifikation soll die Verpflanzung eines osteokutanen Skapulalappens im gefäßverarmten Hals ohne Veneninterponate ermöglichen. Dabei wird die A. thoracodorsalis zusammen mit dem distalen Ende der A. subscapularis sowie der daraus abgehenden, lappenversorgenden A. circumflexa scapulae gehoben. Im Gegensatz zum herkömmlichen Skapulalappen, bei dem die A. circumflexa scapulae als Anschlussgefäß dient, wird bei dieser Modifikation die A. thoracodorsalis für den arteriellen Gefäßanschluss herangezogen. Der arterielle Blutfluss erfolgt dann gegenläufig durch die A. thoracodorsalis, über den Stumpf der A. subscapularis in die A. circumflexa scapulae und darüber in den Lappen. Nachteilig bei dieser Methode ist vor allem, dass durch das Miteinbeziehen der A. thoracodorsalis die Möglichkeit einer späteren Hebung eines myokutanen Latissimuslappens vergeben wird. Zudem ist meist für den venösen Gefäßanschluss ein Veneninterponat notwendig (WONG *et al.* 2010).

Arterien mit rückwärtigem Fluss

Fehlen arterielle Anschlussgefäße mit entsprechendem anterogradem Blutfluss, kann ein arterielles Gefäß mit retrogradem Fluss als Anschlussgefäß verwendet werden. So weist der paramandibuläre Anteil der A. facialis durch die multiplen Kollateralkreisläufe im Gesicht einen retrograden Fluss von 76% des systemischen Blutdrucks auf, der selbst nach Verschluss der gegenseitigen A. facialis nicht signifikant absinkt (HÖLZLE *et al.* 2009). HÖLZLE *et al.* (2009) präsentieren eine Fallserie von 20 mikrovaskulären Perforanslappen, die nach Anschluss an den distalen Stumpf der A. facialis über einen retrograden Fluss zur Einheilung gebracht werden konnten. Der Gefäßdurchmesser von distaler Fazialisarterie und arteriellem Perforansgefäß waren vergleichbar (ca. 1,3 mm). Die Nähe der distalen A. facialis zum De-

fekt kompensiere für die kurze Stiellänge der Perforanslappen (HÖLZLE *et al.* 2009). Nachteilig bei Verwendung dieser Methode ist die Gefahr der Schädigung des R. marginalis mandibulae n. facialis und die Lage der A. facialis im Strahlenfeld. Auch sind Gefäßdurchmesser und Blutdruck für größere, osteomyokutane Lappen möglicherweise zu gering. Da Patienten mit gefäßverarmtem Hals zudem in der Regel starke paramandibuläre Vernarbungen aufweisen, wird die Identifikation und gefäßerhaltende Präparation des proximalen Fazialisstumpfes in den seltensten Fällen erfolgversprechend sein.

Venöse Lappen

Eine weitere Methode, mikrovaskuläre Lappen bei begrenztem arteriellem Gefäßangebot zu transplantieren, sind sogenannte venöse Durchflusslappen, bei denen die Substratversorgung des Transplantats über eine einzelne, den Lappen durchfließende Vene gewährleistet wird (MAEDA *et al.* 1993). Die Arterie wird im Vorfeld durch Anschluss an ein arterielles Gefäß „arterialisiert“, wodurch es zu charakteristischen strukturellen Änderungen der Gefäßwand kommt und die Erfolgsrate des venösen Lappens erhöht werden kann (TANG *et al.* 2008). Der genaue Mechanismus arterialisierter venöser Lappen ist noch unklar (KLEIN 2000). SAFAK UND AKYUREK (2001) beschreiben die erfolgreiche Einheilung eines an der V. cephalica gestielten venösen Lappens aus dem anteromedialen Oberarm in einen zervikalen Defekt bei einem Patienten mit schwersten Verbrennungen in der Hals- und Oberkörperregion. Der Hauptnachteil venöser Lappen ist die im Vergleich zu herkömmlichen mikrovaskulären Lappen deutlich erhöhte Nekroserate von bis zu 40%, vor allem bei Rekonstruktionen in der Mundhöhle (KOVACS 1998; KLEIN 2000).

Durchflusslappen

Das Konzept eines Durchflusslappens, bei dem proximales und distales Ende des versorgenden Gefäßes anastomosiert werden, um einen Blutfluss in distale Gewebe zu ermöglichen, wurde 1983 von SOUTAR *et al.* erstmalig beschrieben (z.i. BULLOCKS *et al.* 2006). SOUTAR *et al.* (1983) etablierten einen ungehinderten arteriellen Blutfluss zwischen A. carotis externa und distaler A. facialis über einen Radialislappen. Neben dem heute am häufigsten verwendeten Radialis-Durchflusslappen existieren zahlreiche weitere Durchflusslappen (BULLOCKS *et al.* 2006), die vor allem in der Rekonstruktion ischämischer Extremitäten eine Rolle spielen. HANASONO *et al.* (2009) empfehlen bei verarmtem Gefäßstatus und Transplantation von mehr als einem mikrovaskulären Lappen die Verwendung eines Gefäßabgangs des Lappenstiels des ersten Lappens als Anschluss für einen Zweiten (Abb. 1.5). Die Gestaltung des ersten Lappens als Durchflusslappen wäre eine weitere Möglichkeit zum Einsparen von Anschlussgefäßen bei Verwendung von mehr als einem Lappen im gefäßverarmten Hals. HANASONO *et al.* (2009) vermeiden jedoch die serielle Anastomosierung mehrerer Lappen aufgrund von Problemen wie Kalibersprüngen, insuffizientem arteriellem Blutfluss durch

ein Steal-Phänomen und eine ungünstige Gefäßstielgeometrie. Das Prinzip des Durchflusslappens ist eine wichtige Grundlage für den im nächsten Kapitel beschriebenen „Carrierflap“.

1.3.3 MIKROVASKULÄRE LAPPEN OHNE LOKALEN GEFÄßANSCHLUSS

1.3.3.1 Roll- und Wanderlappen

Bereits gegen Ende des Mittelalters waren Techniken zur Gewebeverpflanzung ohne Gefäßanschluss bekannt. Gaspare TAGLIACOZZI (1597) beschreibt in dem ersten Buch über Plastische und Rekonstruktive Chirurgie eine Methode der Nasenrekonstruktion mit Hilfe eines gestielten Oberarmlappens (Abb. 1.6). TAGLIACOZZI beschreibt darin sechs Schritte, in denen der Oberarmlappen, damals noch ohne Anästhesie, in den vorpräparierten Nasendefekt verlagert und dort fixiert wird. Der Unterarm wurde über eine spezielle lederne Weste mit Haube mehrere Wochen lang auf dem Kopf des Patienten fixiert, bis eine Randomisierung des Gefäßnetzwerkes des Gewebes im Gesicht stattgefunden hatte und der Stiel durchtrennt werden konnte. Die Methode hat heute als sog. Roll- oder Wanderlappen vorwiegend historische Bedeutung (DRAGU *et al.* 2008).



Abb. 1.6: Extremitätenbasierte Lappen. Parallelen zwischen historischen und modernen Rekonstruktionsmethoden in schwierigen Fällen der Gesichtsrekonstruktion. *Links:* Die „italienische Methode“ der Nasenrekonstruktion mit Hilfe eines gestielten Oberarmlappens nach Gaspare TAGLIACOZZI (1597). *Rechts:* Knöcherne und weichgewebige Rekonstruktion des Kiefers mit Hilfe eines Carrier-Lappens bestehend aus einem mikrovasculären anterolateralen Oberschenkelappen und einem mikrovasculären Fibulalappen, die, in Reihe geschaltet, über ein „Carrier“-Gefäß am Handgelenk (A. radialis) temporär versorgt werden. Bildausschnitt aus WOLFF *et al.* (2009). Beide Methoden basieren auf der Autonomisierung des in den Gesichtsdefekt eingebrachten Gewebes.

1.3.3.2 Carrier-Lappen

Als mikrochirurgische Weiterentwicklung des oben beschriebenen Wanderlappens kann der sog. „Carrierflap“ (*deu.* Trägerlappen) verstanden werden (Abb. 1.6). Hierbei wird ein defektnahes, mikrovasculäres Transplantat gehoben und an ein Trägergefäßbündel in einer defektnahen bzw. -näherbaren Region angeschlossen. Anschließend wird der Lappen vergleichbar mit einem gestielten Lappen mit den stielfernen Gewebeanteilen in den Defekt eingnäht und solange über die Trägergefäße perfundiert, bis aus der Peripherie des Defekts

eine autonome Gefäßversorgung etabliert wurde. WOLFF *et al.* (2003; 2009) beschreiben die knöcherne und weichgewebige Unterkieferrekonstruktion in einem Patientenfall mit „vessel depleted neck“ mit Hilfe eines seriellen Doppellappens (Durchflusslappen) aus mikrovaskulärer Fibula und anterolateralem Oberschenkelappen über einen Carrier am Handgelenk. Auf diese Weise war die Transplantation zweier großer zusammengesetzter Gewebeblöcke ohne lokalen Gefäßanschluss möglich. Das verpflanzte Gewebe war am 18. postoperativen Tag autonom vom versorgenden Gefäßstiel am Handgelenk, so dass dieser abgesetzt werden konnte. Der hohe operative Aufwand und die beträchtliche Spenderseiten-Morbidität müssen als Nachteile dieser Methode gewertet werden. Die Carrierlappen-Methode erfordert mindestens zwei Spenderregionen (eine für den Gewebelappen und eine weitere für die Gefäßversorgung). Die tagelange Fixation der Arms in Überkopfstellung ist zudem mit einem hohen Risiko der Schultergelenksversteifung verbunden (GIEßLER 2013). Aufgrund der Ausrissgefahr des Lappens, umständlichen Verbandswechsels, Lagerung sowie der Gefahr der Schultergelenkeinsteifung gilt diese Methode als Reserveverfahren (GIEßLER 2013).

1.3.3.3 Extrakorporale Perfusion von mikrovaskulären Transplantaten

Der oben beschriebene „Carrierlappen“ schlägt nicht nur die Brücke zwischen historischen Methoden der Gewebeverpflanzung ohne Gefäßanschluss und modernen mikrochirurgischen Techniken, sondern kann auch als direkte gedankliche Vorarbeit zu der in dieser Arbeit thematisierten extrakorporalen Lappenperfusion (ECP, extrakorporale Perfusion) verstanden werden. Wie der historische Rolllappen ermöglicht der Carrierlappen eine Gewebeverpflanzung ohne lokalen Gefäßanschluss und basiert ebenfalls auf der Autonomisierung des eingebrachten Gewebes im Defekt. Die Kenntnis der Technik freier Lappenverpflanzungen ermöglicht jedoch über einen direkten Zugang zu den versorgenden Gefäßen auch die Verpflanzung großer gemischter Gewebeblöcke. WOLFF *et al.* (2003; 2009) konnten zeigen, dass auf diese Weise transplantiertes Gewebe innerhalb von 18 Tagen unabhängig von dem Carriergefäß ist und nach Ligatur des Gefäßstiels einheilte. Als logische technologische Weiterentwicklung dieser operativen Methode ließe sich eine Maschine konstruieren, mit deren Hilfe ein Gewebetransplantat ohne die Notwendigkeit einer temporären Versteifung von Gelenken so lange über einen extrakorporalen Kreislauf vital erhalten werden kann, bis das Gewebe in den Defekt eingeeilt ist und die Perfusion beendet werden kann. Unabhängig von der lokalen Gefäßsituation ließe sich auf diese Weise die Transplantation mikrovaskulärer Lappen auch ohne Gefäßanschluss realisieren, wodurch die rekonstruktive Therapie um ein mächtiges Therapieinstrument in schwierigen Fällen ergänzt würde. Die theoretischen therapeutischen und wissenschaftlichen Anwendungsmöglichkeiten eines solchen Systems sind jedoch wesentlich vielfältiger, worauf in der Diskussion ausführlich eingegangen werden soll (siehe Kapitel „Ausblick“ ab Seite 132).

1.4 ZIELSETZUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Evaluation eines Systems zur extrakorporalen Perfusion von Geweben im Kleintiermodell sowie die *in vivo* Anwendung dieses Systems. Aufgabe des Systems war der Vitalerhalt des Gewebes durch Aufrechterhaltung möglichst physiologischer Verhältnisse im Gewebe. Der Aufbau des Systems sollte dabei in seinen Grundzügen einer miniaturisierten Variante einer modernen Herz-Lungen-Maschine entsprechen. Wie aus der Herzchirurgie und Transplantationsmedizin bekannt ist, führen vergleichbare, wenngleich deutlich aufwändigere und auf größere Volumina ausgerichtete Systeme zu einer progredienten mechanischen Schädigung korpuskulärer Blutbestandteile (Hämolyse). Erschwerend kommt hinzu, dass das Wissen auf dem Sektor der extrakorporalen Gewebepfusion limitiert ist. Grundlegende Informationen zu Druckverhältnissen, Volumina, Zusammensetzung eines optimalen Perfusats sind bisher ebenso unbekannt wie die Veränderungen im Gewebe während einer solchen extrakorporalen Perfusion.

In einem ersten Schritt sollten daher zunächst folgende grundlegenden Fragen geklärt werden:

- Welche Volumina benötigt das zu perfundierende Gewebe unter physiologischen Bedingungen?
- In welchem Zeitraum und in welchem Ausmaß ist im Rahmen einer extrakorporalen Perfusion mit dem von uns entwickelten System mit Hämolyseerscheinungen zu rechnen?

In einem zweiten Schritt sollte anschließend das extrakorporale Perfusionssystem *in vivo* zur „warmen“ Preservierung (Zimmertemperatur) mikrovaskulärer Transplantate im Tiermodell über einen Zeitraum angewendet werden, den das Gewebe bei Lagerung unter analogen Bedingungen jedoch ohne Perfusion nicht tolerieren würde. Als Tiermodell wählten wir das epigastrische Lappenmodell in der Ratte (STRAUCH UND MURRAY 1967), mit dem unser Team bereits hinreichend Erfahrungen gesammelt hatte (MÜCKE *et al.* 2011; 2013; FICHTER *et al.* 2014)

Folgende Fragen sollten im Rahmen der *in vivo* Untersuchungen geklärt werden:

- Lässt sich in dem gewählten Tiermodell eine extrakorporale Lappenperfusion etablieren und über einen Zeitraum von acht Stunden aufrechterhalten?
- Ist eine Vitalerhaltung dünner Hautlappen über einen Zeitraum von acht Stunden mit Hilfe des extrakorporalen Perfusionssystems möglich?
- Ist eine Vitalerhaltung dünner Hautlappen über einen Zeitraum von acht Stunden ohne Hilfe des extrakorporalen Perfusionssystems unmöglich? (Negativkontrolle)
- Heilen Hautlappen nach extrakorporaler Perfusion über einen Zeitraum von acht Stunden nach anschließender Transplantation ein?
- Welche physiologischen Vorgänge spielen sich während extrakorporaler Perfusion im Lappen bzw. im verwendeten Perfusat ab?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 STUDIENAUFBAU

Die vorliegende Studie gliedert sich inhaltlich in zwei Abschnitte. Im ersten Abschnitt werden die Entwicklung des Perfusionssystems sowie die *in vitro* Evaluation des Systems beschrieben. Diese Vorversuche umfassen Flussmessungen an Gefäßen der Ratte zur Festlegung adäquater Perfusionseinstellungen sowie Analysen der Blutzusammensetzung (Blutgasanalyse, klinisch-chemische Untersuchungen, Bestimmung von Hämolyseparametern) von murinem und humanem Vollblut während mehrstündiger Zirkulation durch das System. Da die Ergebnisse dieser Vorversuche für den zeitlichen, und eigentlichen Hauptteil der Arbeit von essentieller Bedeutung sind, beinhaltet der Methodikteil, entgegen gängiger Konventionen, neben methodischen Aspekten auch Ergebnisse und weiterführende inhaltliche Diskussionen.

Im zweiten Teil wird die *in vivo* Anwendung des Perfusionssystems zur Vitalerhaltung mikrovaskulärer Lappentransplantate im Tiermodell beschrieben. Als Tiermodell wird der epigastische Lappen der Ratte gewählt, der mikrochirurgischer Lappen gestielt an den superfiziellen epigastrischen Gefäßen der Ratte (STRAUCH UND MURRAY 1967) gehoben wird (siehe Kapitel 2.3.3 „Versuchsmodell und Anatomie“ auf Seite 43).

Der Begriff Vorversuch ist dabei inhaltlich zu verstehen, zumal die im ersten Teil beschriebenen Flussmessungen und Untersuchungen zur Hämolyse zum Teil parallel zu den *in vivo* Versuchen stattfinden und sich dem Kollektiv der Kontrollgruppen bedienen. Weiterführende Informationen zu den verwendeten Versuchstieren und Haltungsbedingungen finden sich daher erst im zweiten Teil bei der Beschreibung der Tierversuche (siehe Kapitel 2.3 „Vitalerhaltung mikrovaskulärer Lappen im Rattenmodell“ auf Seite 42).

2.2 VORVERSUCHE

2.2.1 ENTWICKLUNG EINES PERFUSIONSSYSTEMS ZUR GEWEBEERHALTUNG

Erste Pilotversuche zur Perfusion muriner Hautlappen erfolgen in Kooperation mit den Kollegen des Deutschen Herzzentrums München, an einem für die Perfusion isolierter Organe in der Ratte entwickeltem Perfusionssystem (THEIN *et al.* 2001). Das System besteht aus einem temperierten Reservoir (37°C), einem Membranoxygenator, einem Hämofilter, einer Blasenfalle, einer Rollerpumpe und ein Schlauchsystem mit einer Gesamtlänge von 4,5 Metern (Abb. 2.1A). THEIN *et al.* (2001) konnten zeigen, dass dieses System (bei kontinuierlicher Zirkulation ohne Anschluss eines Organs) über einen Zeitraum von 90 min keinen negativen Einfluss auf die Zusammensetzung vollheparinisierten humanen Vollblutes (Zellzählung, Thrombozytenaktivierung, Komplementaktivierung) hatte. Untersuchungen zur Organperfu-

sion wurden in diesem Zusammenhang nicht durchgeführt, da das Perfusat im Fokus der Fragestellung stand (THEIN *et al.* 2001).

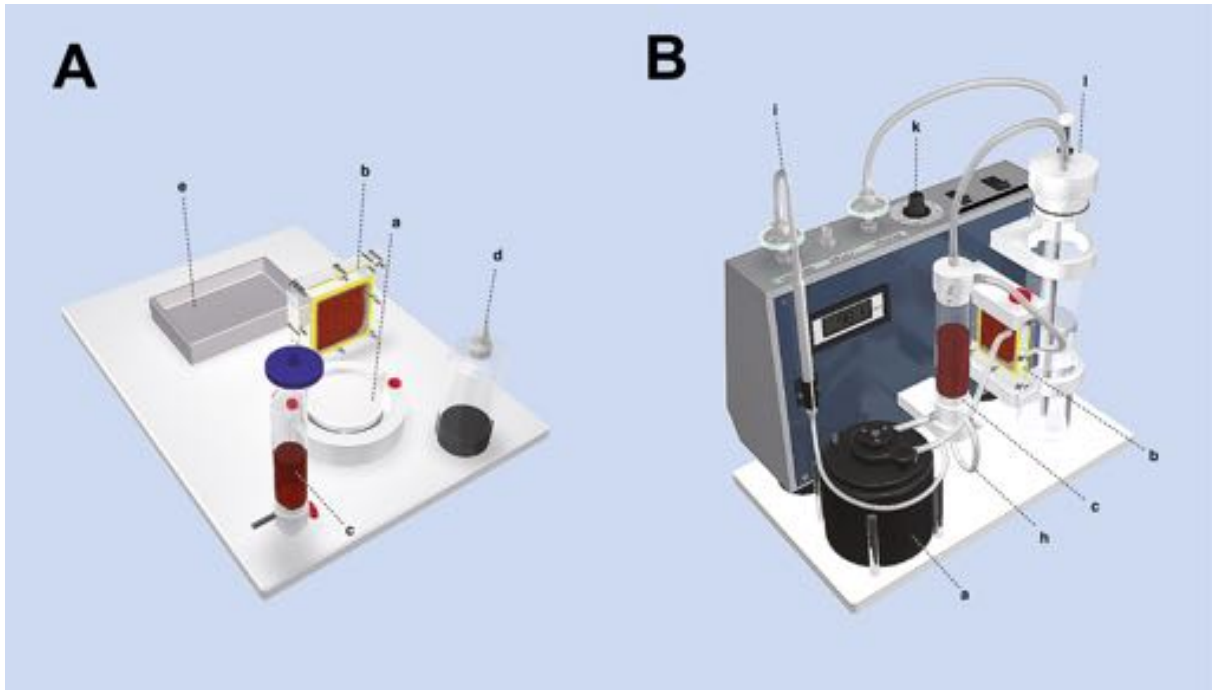


Abb. 2.1. Perfusionssysteme zur Perfusion von Organen im Kleintiermodell. (A) Perfusionssystem der 1. Generation (3D-Modell) bestehend aus Rollerpumpe (a), Reservoir (c), Membranoxygenator (b), Blasenfalle (d) und einer Schale für die Lagerung des Transplantats und zum Auffangen und Reperfundieren von austretendem Blut. (B) Perfusionssystem 2. Generation (3D-Modell) mit zusätzlichem Druckausgleichschenkel (h), stufenweise regulierbarer Pumpleistung (k), Barometer mit Digitalanzeige (i) und einem Unterdrucksystem zum Aufbau eines justierbaren Sogs im venösen System (l). Teilbild B modifiziert nach MÜCKE 2013, mit freundlicher Genehmigung vom Autor.

Mit Hilfe dieses Systems gelingt die Vitalerhaltung epigastrischer Lappen der Ratte über mehrere Stunden unter Verwendung vollheparinisierten (25 IE/ml) verdünnten murinen Vollblutes (Abb. 2.2, unveröffentlichte Daten). Allerdings beobachten wir bereits nach einer Stunde Perfusionszeit eine deutliche Volumen- und Gewichtszunahme des Lappens durch ausgeprägte Ödembildung sowie einen unkontrollierten Blutverlust aus der Peripherie des Lappens. Die Ursachen für diese Beobachtungen sehen wir in der (1) Zusammensetzung des (hochdilutierten) Perfusats (50% Ringer-Lösung, 50% Vollblut), in der durch die (2) Vollheparinisierung verursachten Blutungsneigung und in (3) unkontrollierten Blutdruckspitzen die durch das vorgebene Flussvolumen bei fehlender Druckkontrolle entstehen. Die Ödembildung wird zudem durch einen (4) gestörten venösen Abfluss unterstützt. Ursachen hierfür sehen wir zum einen in der fehlenden Sogwirkung im Niederdrucksystem und zum anderen in einer möglichen Störung der Mikrozirkulation durch Blutdruckspitzen und Verlegung der Endstrombahn durch Mikrothromben im Rahmen von Hämolyseprozessen.



Abb. 2.2. Erstes Perfusionssystem im Einsatz. Lappenhebung vor den ersten *in vivo* Pilotversuchen mit dem Perfusionssystem der ersten Generation. Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Dr. Mücke, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Klinikum rechts der Isar, München.

Zu (1): Hämodilution führt gemäß des Hagen-Poiseuille-Gesetzes zu einer Steigerung des Blutflusses. Gleichzeitig wird jedoch über eine Verschiebung der Starling-Kräfte die Ödementstehung begünstigt (KLINKE UND SILBERNAGEL 1996). So bedingt der prozentual hohe Anteil von kristalloidem Flüssigkeitsersatz (Ringer) an dem von uns verwendeten Perfusat durch Senkung des kolloidosmotischen Drucks die Entstehung von Ödemen im Gewebe. In Hinblick auf die Reduktion dieser unerwünschten Ödembildung beobachten wird nach Testung verschiedener Perfusatzusammensetzungen die besten Ergebnisse bei Verwendung eines weniger verdünnten Vollblutgemischs mit zusätzlicher Beimischung eines Plasmaexpanders. Auf das Perfusat wird in Kapitel 2.2.3.2 „Perfusionsdrücke und Perfusatzusammensetzung“ ab Seite 38 genauer eingegangen.

Zu (2): Kontakt von Blut mit artifiziellen Oberflächen führt zu Zell- und Komplementaktivierung (SUNDARAM *et al.* 1994; BAKSAAS *et al.* 1999, z.i. THEIN *et al.* 2001). Dies kann zu Zella-dherenz und über eine Aktivierung des Gerinnungssystems zu Thrombenbildung in dem verwendeten Schlauchsystem sowie zu Störungen der Mikrozirkulation des perfundierten Organs/ Lappens führen (THEIN *et al.* 2001). Eine Antikoagulation ist daher weiterhin zwingend erforderlich. Allerdings lässt sich die Heparindosierung von 25 IE/ml auf 10 IE/ml reduzieren, ohne eine Thrombenbildung innerhalb des Schlauchsystems auszulösen.

Zu (3): Blutdruckkrisen führen zu Schädigung von Endorganen (FEIHL *et al.* 2009). Dies ist bei der extrakorporalen Perfusion eines Endorgans (in unserer Studie die Haut) von besonderer Bedeutung, da keine Umgehungskreisläufe existieren und sich Blutdruckspitzen nicht auf verschiedene Organe verteilen, sondern direkt auf das perfundierte Gewebe einwirken.

Wir tragen dieser Überlegung Rechnung, indem wir in die Konstruktion der nächsten Pumpengeneration einen Regulator integrieren, durch den sich eine Blutdruckobergrenze festgelegt werden kann.

Zu (4): Während arterialisiertes Blut durch das verwendete Perfusionssystem problemlos in den Lappen gepumpt wird und sich typische klinische Zeichen eines vitalen Lappens beobachten lassen (Rekapillarisierungsphänomen, Blutaustritt aus feinsten Gefäßen der Lappenperipherie), zeigt sich praktisch kein venöser Rückfluss. In der Literatur ist diese Beobachtung als „no reflow“ Phänomen (CHAIT *et al.* 1978; MAY *et al.* 1978; ROSEN *et al.* 1985; WANG *et al.* 1996) und kann Ausdruck eines gestörten Metabolismus sein. Typische Zeichen einer venösen Stauung, wie Livideverfärbung der Hautinsel fehlen jedoch ebenfalls, was sich durch den niedrigen Hb des hochdilutierten Perfusats und durch den hohen Blutverlust aus der Peripherie des Transplantats erklären lässt. Die nächste Pumpengeneration soll daher so konstruiert werden, dass ein regulierbarer Sog auf das venöse System ausgeübt werden kann, um den venösen Rückfluss zu stimulieren.

Die oben beschriebenen Überlegungen sind die Grundlage für die Entwicklung eines neuen Perfusionssystems, das nach unseren klinischen Vorstellungen von einem Ingenieur technisch umgesetzt wird (Abb. 2.1B, MÜCKE 2013). Neben den oben beschriebenen Elementen verfügt das Perfusionssystem der zweiten Generation über Mechanismen zur Druckregulation und zum Aufbau eines Sogs im venösen System. Die Druckregulation ist durch ein Bleigewicht im Boden des Reservoirs verwirklicht, das sich ab einem durch das Gewicht vorgegebenem nicht justierbarem Druck (120 mmHg) hebt, wodurch sich ein Kurzschlusskreislauf zwischen Rollerpumpe und Reservoir öffnet. Der aktuelle Druck im System wird mit Hilfe eines Barometers (Fa. GHM Messtechnik GmbH, Regenstauf) gemessen (Abb. 2.1B,i). Der Sog auf das venöse System erfolgt über eine Wassersäule, vergleichbar mit einer Thoraxdrainage.

Obwohl erste Pilotversuche mit dem neuen System in Bezug auf Ödementstehung und Blutverlust vielversprechende Ergebnisse zeigen und auch erste Replantationen nach mehrstündiger extrakorporaler Perfusion gelingen (MÜCKE 2013), weist das System eine Reihe schwerwiegender technischer Schwachpunkte auf, die uns in der Folge zum Verlassen des Systems bewegen. Zum einen birgt das System durch die fehlende Möglichkeit der Sterilisation der mit Blut in Kontakt kommenden Teile eine erhöhte Infektionsgefahr – ein Hauptproblem bei der extrakorporalen Perfusion von Geweben laut MAYER *et al.* (1992b). Die Pilotversuche mit diesem Perfusionssystem zeigen zum anderen, dass die Druckregulation nicht, wie gewünscht, über einen längeren Zeitraum funktioniert. Das bewegliche Bleigewicht verklebt oder verkeilt häufig, wodurch die Druckregulation ausfällt. Oder es entwickelt sich ein per-

manenter Kurzschlusskreislauf, der das Abklemmen des Shunt-Schenkels erforderlich macht, womit das Element der Druckregulation zwecklos wird.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Untersuchungen wird also ein drittes Perfusionssystem entwickelt, das mit einer elektronisch gesteuerten Druckregulation ohne anfällige bewegliche Teile ausgestattet ist und die Sterilisation und sterile Anbringung aller mit Blut in Kontakt kommenden Teile ermöglicht. Dies System soll im Folgenden beschrieben werden.

2.2.2 AUFBAU DES VERWENDETEN PERFUSIONSSYSTEMS

Der Aufbau des Perfusionssystems ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Das System ist so konstruiert, dass alle mit Blut in Kontakt kommenden Einzelteile (Schläuche, Konnektoren, Reservoir, Membranoxygenator) steril zusammengesetzt, befüllt und anschließend mit dem Perfusionssystem verbunden werden können. Das Herzstück des Perfusionssystems bildet eine über einen Gleichstromgetriebemotor betriebene Rollerpumpe (Ing. Büro Humbs, Valley). Über einen Membranoxygenator (MO) kann das Blut während der Perfusion mit Sauerstoff (Raumluft oder Sauerstoffflasche) angereichert werden. Der Membranoxygenator besteht aus zwei gefrästen Epoxidharzblöcken, die auf der Innenseite mit je einem herausnehmbaren Silikondichtungsring versehen sind. Beide Epoxidharzblöcke lassen sich über eingefräste Gewinde mit Schrauben nahtlos aufeinander setzen. Zwischen beiden Epoxidharzblöcken wird eine Oxygenatormembran (Typ Oxyphan PP50/280, Fa. Membrana GmbH, Wuppertal) befestigt. Über zwei mit Metallröhrchen versehene Bohrungen gelangt Blut in den Innenraum und kann – nach Passage der Oxygenatormembran – auf der gegenüberliegenden Seite wieder aus dem MO austreten. Der MO wird zwischen Rollerpumpe und arterielles Reservoir geschaltet. Die Reservoirs bestehen aus gefrästen Polyoxymethylen-Zylindern (Ing. Büro Humbs, Valley), auf die sich sterile, handelsübliche, zuvor mit einem Skalpell zurechtgeschnittene 5 ml (arterielles Reservoir) bzw. 10 ml (venöses Reservoir) Einwegspritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufstecken lassen. Je drei mit Metallröhrchen versehene Bohrungen an der Basis des Reservoirs ermöglichen den Zufluss, Abfluss und Druckausgleich zwischen beiden Reservoirs. Beide Reservoirs fungieren als Blasenfänger. Neben dem unterschiedlichen Füllvolumina (5 ml vs. 10 ml) unterscheiden sich arterielles und venöses Reservoir dadurch, dass das venöse Reservoir über einen Silikonschlauch mit einem Unterdrucksystem verbunden ist, über den ein Sog auf den venösen Schenkel ausgeübt werden kann. Das arterielle System hingegen ist über einen Silikonschlauch mit einem Barometer (Panasonic Electric Works SUNX Co., Ltd. Kasugai City, Aichi, Japan) verbunden, der die Druckverhältnisse im Schlauchsystem in mmHg angibt. Um unkontrollierte Blutdruckspitzen zu vermeiden, sind arterielles und venöses System über einen Shunt miteinander verbunden. Dieses Schlauchsegment ist in einer Vorrichtung (Abb. 2.3g) eingeklemmt, die den Shunt bei normalen Druckverhältnissen abklemmt. Steigt der Druck über eine frei

definierbare Schwelle, wird der Blutstrom durch den Shunt solange freigegeben, bis sich die Druckverhältnisse normalisiert haben. Auf diese Weise wird der Druck im arteriellen Schenkel niemals oberhalb der gewählten Druckschwelle liegen, da sich sonst ein Shunt-Kreislauf ergeben würde. Auf der anderen Seite darf die maximale Druckvorgabe nicht zu niedrig gewählt werden, da sonst durch den entstehenden permanenten Kurzschlusskreislauf kein Blut mehr in den arteriellen Schenkel gepumpt würde. Die verwendeten Schläuche bestehen aus platinvernetztem Silikon (USP Klasse IV, FDA-Zulassung) und weisen einen Außendurchmesser von 1,6 mm und einen Innendurchmesser von 0,8 mm auf. Die Gesamtschlauchlänge beträgt 2,5 Meter. Als Konnektoren zwischen den einzelnen Schlauchsegmenten dienen standardisierte Luer-Lock-Anschlüsse aus Polypropylen.

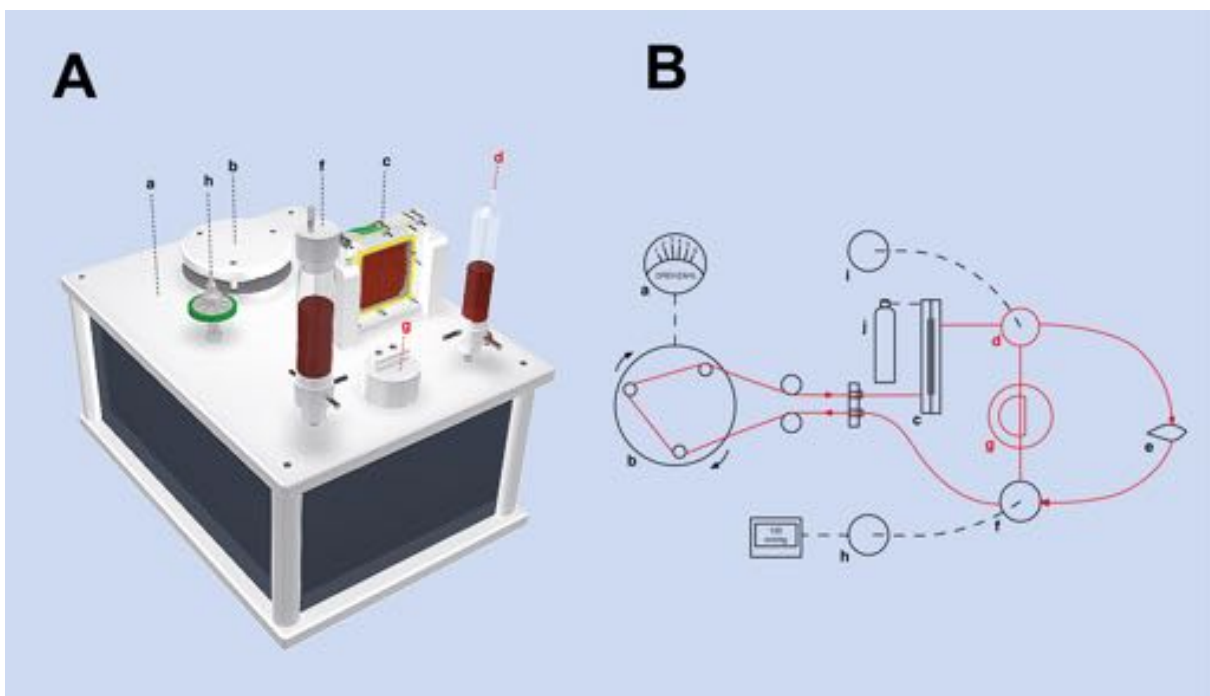


Abb. 2.3. Modifiziertes Perfusionssystem. (A) Perfusionssystem der 3. Generation (3D Modell) mit steril anbringbarem Schlauchsystem, (B) Schematische Darstellung. (a) Steuereinheit, (b) Rollerpumpe, (c) Membranoxygenator, (d) arterielles Reservoir, (e) Lappentransplantat, (f) venöses Reservoir, (g) Druckausgleichschenkel, (h) venöser Sog, (i) Blasenfänger und Druckmessschenkel, (j) Möglichkeit der Sauerstoffzufuhr.

Schläuche, Konnektoren und Oxygenatorenmembranen sind Einwegartikel und werden nach jeder Anwendung verworfen. Das Gehäuse des Membranoxygenators mit den Dichtungsringen sowie das arterielle und venöse Reservoir werden nach jeder Anwendung in Ihre Einzelteile zerlegt und unter fließendem Wasser von Hand gereinigt. Vor jeder Anwendung am Tier werden alle verwendeten Materialien dampfsterilisiert.

2.2.3 IN VITRO EVALUATION DES PERFUSIONSSYSTEMS

2.2.3.1 Flussmessungen am Gefäß

Um das Fördervolumen der Pumpe auf physiologische Werte justieren zu können, bedarf es der Kenntnis des *in vivo* Blutflussvolumens durch die den Lappen versorgenden Zu- und Abflussgefäße, die an das Perfusionssystem angeschlossen werden sollen. Da sich diesbezüglich in der Literatur keine konkreten Aussagen finden, führen wir diese Messungen im Vorfeld am Tiermodell durch. Als Versuchstiere dienen 12 Fischer-344-Ratten (Fa. Charles River Wiga (Europe) GmbH, Kißlegg) aus den Kontrollgruppen K1 und K2 des im nächsten Kapitel beschriebenen Tierversuchs (siehe Kapitel 2.3 „Vitalerhaltung mikrovaskulärer Lappen im Rattenmodell“ auf Seite 42).

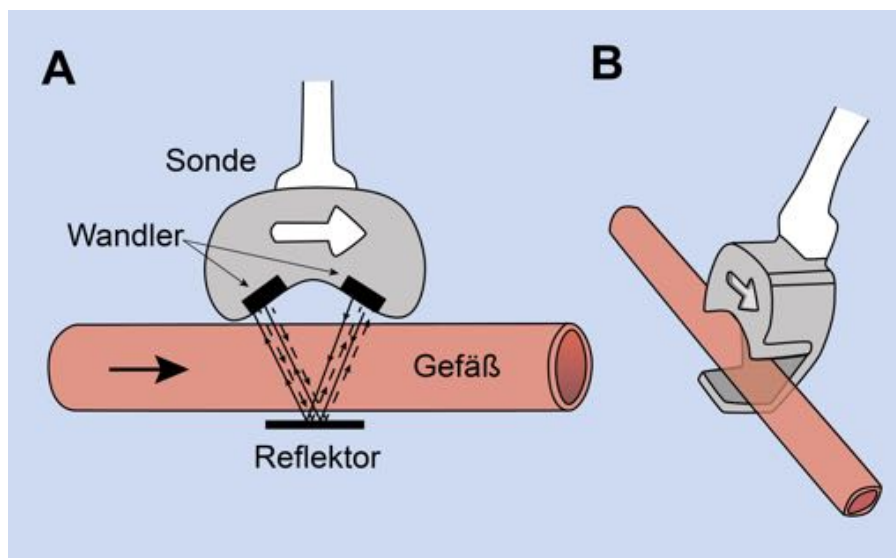


Abb. 2.4: Funktionsweise einer Ultraschall-Flusssonde. (A) Ansicht der „V“-Flusssonde von vorne; das von dem ersten Wandler ausgesandte Ultraschall-Signal wird über einen Reflektor auf der gegenüberliegenden Gefäßwand auf einen zweiten Wandler reflektiert. Ebenso sendet der zweite Wandler Signale aus, die nach Reflektion vom ersten Wandler empfangen werden. Die Laufzeitdifferenzen, die sich durch den fließenden Blutstrom ergeben, dienen zur Berechnung der Blutflussgeschwindigkeit bzw. der Durchflussvolumina. (B) Ansicht von schräg seitlich, modifiziert aus www.wikipedia.de (WIKIPEDIA 2014).

Mit Hilfe eines „noninvasiven“, d.h. die Gefäßwand umgreifenden, jedoch nicht perforierenden Ultraschall-Durchflussmessers, einem sog. „clamp-on transit time flowmeter“ (Transit Time Perivascular Flowmeter TS420, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) und der zugehörigen Sonde (Flow Probe 1,5 mm, Katalognummer MA1PRB, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) ist es möglich, Flussmessungen direkt an den epigastrischen und femoralen Gefäßen der Ratte durchzuführen. Das Prinzip der Durchflussmessung beruht auf der Messung von Laufzeitdifferenzen zwischen einzelnen Dopplerimpulsen und auf der Frequenzverschiebung des Doppler-Effekts. Die in unserem Versuchsaufbau verwendete „V“-Sonde enthält zwei Ultraschallwandler, die sowohl als Sender, als auch als Empfänger

fungieren können (Abb. 2.4). Der erste Wandler emittiert ein Ultraschallsignal, das von einem Reflektor auf der gegenüberliegenden Gefäßwand „V“-förmig zurückgeworfen und von dem zweiten Wandler ausgeslesen wird. Dieser Vorgang funktioniert in beide Richtungen. Für die Berechnung von Flussgeschwindigkeiten und daraus der Berechnung von Durchflussvolumina werden Laufzeitdifferenzen zwischen den ausgesandten Ultraschallimpulsen in und gegen die Flussrichtung herangezogen und die Frequenzverschiebung des Dopplereffekts erfasst.

Flussmessungen werden an epigastrischen und femoralen Gefäßen von 12 Versuchstieren nach Freilegung der Gefäße zu den Zeitpunkten (1) vor Lappenhebung und (2) nach Lappenhebung durchgeführt. Die Versuchstiere stammen aus dem Kollektiv der Kontrollgruppen K1 und K2 (siehe Kapitel 2.3.1.1 „Experimentelle Gruppen“ ab Seite 42). Details zum operativen Vorgehen finden sich in Kapitel 2.3.5 „Operative Methoden“ auf Seite 49.

2.2.3.2 Perfusionsdrücke und Perfusatzusammensetzung

Das von uns verwendete Perfusionssystem (Abb. 2.3) erlaubt eine stufenlose Einstellung des gewünschten Fördervolumens. Die Vorgabe eines gewünschten Perfusionsdrucks ist hingegen nur indirekt möglich. Um Gewebeschädigungen, durch unkontrollierte Blutdruckspitzen bedingt durch temporäre Vasospasmen, Thromben oder anders begründete periphere Widerstandserhöhungen zu vermeiden, ist die Vorgabe eines Maximaldrucks möglich. Wird dieser überschritten, öffnet sich elektronisch gesteuert ein Shunt-Kreislauf zwischen arteriellem und venösem Reservoir, der solange aufrechterhalten wird, bis der Druck im Schlauchsystem wieder unter die vorgegebene Druckobergrenze gefallen ist. Der vorgegebene Maximaldruck bezieht sich auf den Druck innerhalb des Schlauchsystems oder konkreter auf den arteriellen Schenkel des Schlauchsystems und entspricht nicht zwingend den Druckverhältnissen im arteriellen Gefäß bzw. im Lappen.

Wird der maximale Druck zu hoch gewählt, besteht die Gefahr einer Druckschädigung in der Endstrombahn. Wird der maximale Druck hingegen deutlich zu niedrig gewählt, entsteht ein permanenter Shuntkreislauf auf Mitteldruckniveau, wodurch die Gefahr besteht, dass kein Blut mehr über den arteriellen Schenkel gefördert wird oder sogar retrograd in das System zurückfließt. Der Blutdruck der Ratte wird in der Literatur bei 84–134 mmHg systolisch und 60 mmHg diastolisch angegeben (WOLFENSOHN UND LLOYD 2003). Für die *in vivo* Untersuchungen legen wir die Druckobergrenze bei 130 mmHg systolisch und damit auf relativ hohem physiologischem Niveau fest. Das Blutflussvolumen wird auf 2,20 ml/min fest eingestellt, was gemäß unserer Flussmessungen an den Femoralgefäßen ebenfalls hochnormalen Werten entspricht (siehe Kapitel 3.1.1 „Flussgeschwindigkeit“ ab Seite 65).

Um auch bei der Wahl des Perfusats möglichst physiologische Rahmenbedingungen zu schaffen, wird in allen Versuchen vollheparinisierendes Vollblut verwendet. In erster Linie aufgrund der relativ geringen Blutmenge (wenige Milliliter), die von einer Ratte gewonnen werden kann, wird zur Reduzierung der notwendigen Versuchstierzahl für die *in vivo* Untersuchungen auf verdünntes Vollblut ausgewichen. In den oben beschriebenen Vorversuchen zur Entwicklung des Perfusionssystems (siehe Kapitel 2.2.1 auf Seite 31) wurde Ringer Lösung als Dilutor verwendet. Dies führte jedoch zu einer ausgeprägten Ödembildung und – in Kombination mit der notwendigen Vollheparinisierung – zu einem intolerabel hohen Blutverlust aus dem Transplantat. Daher entscheiden wir uns für die folgenden Tierversuche zusätzlich zu dem kristalloiden (Ringer) noch einen kolloidalen Plasmaersatz zu verwenden. Die Wahl fiel auf Hydroxyethylstärke (HES), ein Stärkepräparat, das durch Hydroxyethylierung vor dem Abbau durch das körpereigene Enzym Alphaamylase geschützt ist. Aufgrund seiner hohen Wasserbindungsfähigkeit gilt HES als Plasmaexpander. Durch den Zusatz von HES soll die Extravasation und damit die Ödembildung reduziert werden. Gemäß des Hagen-Poiseuille-Gesetzes (KLINKE UND SILBERNAGEL 1996) wird durch Hämodilution über eine Herabsetzung der Viskosität des Blutes der Blutfluss erhöht. HES führt zu einer verminderten Thrombozytenaggregation (BOLDT *et al.* 1993). Von anderen kolloidalen Plasmaersatzmitteln ist zudem eine Reduktion des Thromboserisikos nach Mikroanastomosen bekannt (z.i. ROBITZKY 2015). Unsere Arbeitsgruppe beobachtete nach HES-Gabe eine Reduktion der Nekroserate perforatorbasierter Hauttransplantate im Rattenmodell (ROBITZKY 2015). Die Tageshöchstdosis des von uns eingesetzten HES Präparats (Molekulargewicht 130 kD, Volulyte[®], Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.) liegt bei 50 ml/kg KGW (STRIEBEL 2012). Aufgrund des Nebenwirkungsprofils wird die „Anwendung hydroxyethylstärkehaltiger Infusionslösungen“ am Menschen mittlerweile nicht mehr empfohlen (BfArM 2013).

2.2.3.3 Aufbau des Systems und Ablauf der *in vitro* Untersuchungen

Verwendet wird das in Abbildung 2.3 dargestellte Perfusionssystem. Das Schlauchsystem wird jedoch so modifiziert, dass ein geschlossener „Shunt“-Kreislauf entsteht. Hierzu werden arterieller und venöser Schenkel des noch unbefüllten Schlauchsystems über einen Dreiwegehahn miteinander verbunden. Etwa 30 Minuten vor Beginn der Untersuchungen wird das Schlauchsystem mit Heparin-versetzter (Heparin-Natrium, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm) Ringerlösung (Fa. DeltaSelect, Dreieich) gefüllt, die Pumpleistung auf 5 ml/min reguliert und so das Schlauchsystem durchgespült.

Ringerlösung	10 ml
Heparin-Natrium	100 IE

Die nachfolgend beschriebenen Blutuntersuchungen werden sowohl mit murinem als auch mit humanem Vollblut durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in beiden Fällen gleich. Das humane Blut entstammt acht freiwilligen Spendern (Doktoranden, Studenten im Praktischen Jahr und Mitarbeitern unserer Abteilung). Zur Befüllung des Systems werden 10 ml vollhepariniertes humanes venöses Vollblut verwendet (1 IE Heparin/ml Blut).

Das murine Blut entstammt den Spendertieren aus den im Kapitel 2.3.1.1 ab Seite 42 beschriebenen *in vivo* Versuchen. Zur Befüllung des Systems werden ca. 4 ml vollheparinisier-tes (1 IE Heparin/ ml Blut) murines Misch-Vollblut aus der Bauchaorta sowie der V. femoralis oder der Schwanzvene entnommen. Weiterführende Informationen zu Narkose und operativem Vorgehen bei der Blutabnahme finden Sie in Kapitel 2.3.5 „Operative Methoden“ ab Seite 49. Informationen zu Tierstamm und Haltungsbedingungen entnehmen Sie bitte Kapitel 2.3.2 „Versuchstiere und Haltung“ auf Seite 43. Der Vorgang der Blutentnahme wird in Kapitel 2.3.6.3 „Blutentnahme Ratte“ auf Seite 56 im Detail beschrieben.

Anschließend wird der Inhalt des Schlauchsystems über einen Dreiwegehahn geleert, das venöse Reservoir mit dem entnommenen Blut befüllt und letzteres mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min durch das Schlauchsystem zirkuliert.

Unmittelbar nach Abnahme, sowie in stündlichen Abständen über einen Zeitraum von acht Stunden, werden Blutproben mit einer Kapillare entnommen und eine Blutgasanalyse sowie eine Hämolyse diagnostik durchgeführt. Die einzelnen technischen Verfahren und Parameter werden nachfolgend erklärt.

2.2.3.4 Bestimmung der Hämolyseparameter

Rollerpumpen und andere Pumpsysteme, Membranoxygenatoren und bereits der Kontakt von Blut mit Fremdkörpern können zu Hämolyse führen (MAYER UND KAEMPFER 1996; THEIN *et al.* 2001). Mit zunehmender Hämolyse nimmt die Fähigkeit des Blutes Sauerstoff zu transportieren ab. Zudem können zerfallene Erythrozytenbestandteile im hämolytischen Blut zur Verlegung mikrovaskulärer Gefäße führen und so das Überleben des Lappens gefährden. Eine Grundvoraussetzung für den Erfolg einer extrakorporalen Vitalerhaltung von Geweben ist ein System, das nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß zu Hämolyse führt, zumindest über einen längeren Zeitraum bis ohnehin das Perfusat gewechselt werden muss. Als Hämolyseparameter werden Laktatdehydrogenase (SUEDKAMP *et al.* 2004; KATO *et al.* 2006) und Haptoglobin (MARCHAND *et al.* 1980; SHIH *et al.* 2014) herangezogen.

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) kommt in vielen Geweben vor und katalysiert die Oxydation von Laktat zu Pyruvat. Erhöhte Serum-LDH-Spiegel finden sich in erster Linie bei Erkrankungen, die einen erhöhten Zellzerfall zur Folge haben, wie disseminierte Malignome, Schock, megaloblastische Anämie, Muskelerkrankungen, Herzinfarkt und hämolytischer

Anämie. Die LDH-Bestimmung erfolgt indirekt durch Bestimmung der Enzymaktivität mit Hilfe eines UV-Tests. Bei der durch LDH katalysierten Oxydation von Laktat zu Pyruvat wird NAD zu NADH reduziert. Die Bildungsgeschwindigkeit von NAD ist direkt proportional zur LDH-Enzymaktivität und kann photometrisch bestimmt werden. Referenzwerte liegen beim Menschen bei 135–225 U/l (LORENTZ 1995) und bei Ratten bei 135 ± 58 U/l (ZUR 2005).

Haptoglobin wird zur Beurteilung des Schweregrads und Stadiums einer intravasalen Hämolyse eingesetzt (MARCHAND *et al.* 1980; SHIH *et al.* 2014). Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das zu den Transport- und Aktive-Phase-Proteinen gezählt wird. Es bindet freies Hämoglobin im Serum, das bei intravasalen Hämolysevorgängen aus Erythrozyten freigesetzt wird und einen stabilen Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex bildet. Ein erniedrigter Haptoglobinspiegel weist somit auf eine intravasale Hämolyse hin. Erhöhte Haptoglobinspiegel werden hingegen bei Entzündungsvorgängen beobachtet. Die Haptoglobin-Bestimmung basiert auf dem Prinzip der immunologischen Agglutination. Der Test ist spezifisch für humanes Haptoglobin, weshalb dieses Nachweisverfahren nicht für die Hämolysebeurteilung des murinen Blutes eingesetzt werden kann. Die Referenzwerte beim Menschen liegen zwischen 30–200 mg/dl.

Die Messungen werden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben zu Beginn, am Ende und in stündlichen Intervallen über acht Stunden während der Zirkulation des Blutes durch das Perfusionssystem erhoben. Die Analyse erfolgt mit Hilfe eines Laboranalysegeräts (cobas® 8000 modular analyzer, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz).

2.3 VITALERHALTUNG MIKROVASKULÄRER LAPPEN IM RATTENMODELL

2.3.1 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

2.3.1.1 Experimentelle Gruppen

Folgende vier Versuchsgruppen werden untersucht und sollen weiter unten im Detail beschrieben werden:

Gruppe	Operationsmethode	Perfusion	Ischämie	Transfer	Anzahl
K1	Kontrollgruppe 1: „Sham-Operation“	0	0	–	8
K2	Kontrollgruppe 2: Ischämie	0	8	+	8
K3	Kontrollgruppe 3: <i>in vivo</i> Perfusion	8	0	+	8
ECP	Extrakorporale Perfusion	8	0	+	8

2.3.1.2 Zeitlicher Ablauf

Der zeitliche Ablauf der *in vivo* Versuchsreihe ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Das operative Vorgehen und die angewandten Untersuchungsmethoden werden in den folgen Kapiteln ausführlich erläutert.

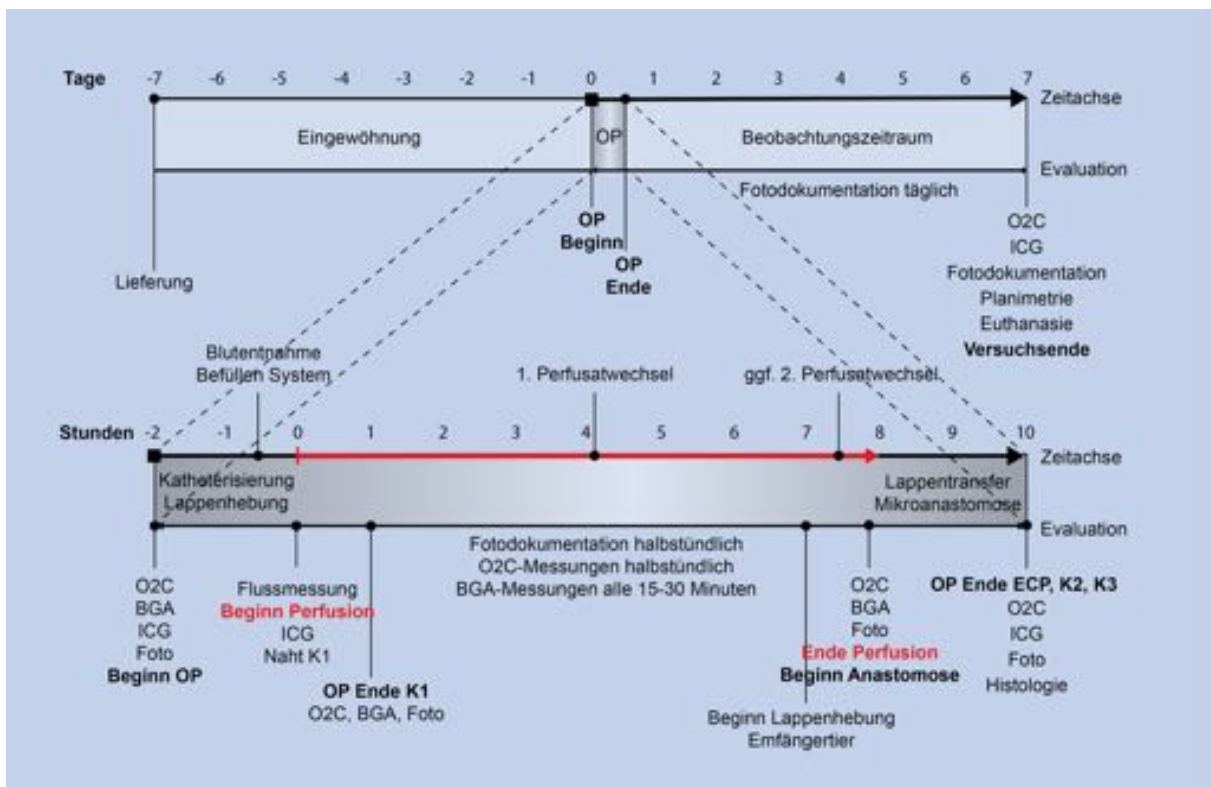


Abb. 2.5: Zeitlicher Ablauf der Versuchsserie. Auf der oberen Zeitleiste ist der gesamte Versuchsablauf in Tagen dargestellt. In der unteren Zeitleiste ist der zeitliche Ablauf des operativen Eingriffs (schwarz) und der Perfusion (rot), sowie die Zeitpunkte der Datenerhebung abgebildet. In Gruppe K1 (Sham Operation) endet der Versuch nach vollständigem Heben und Zurücknähen der Hautinsel bereits zum Zeitpunkt 1 (untere Zeitleiste). Ein Perfusatwechsel wurde nur dann durchgeführt, wenn das System leer ist oder ein kritischer pH-Wert erreicht wird.

2.3.2 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG

Als Versuchstiere werden 64 männliche Fischer-344-Ratten (Fa. Charles River, Kißlegg) zwischen 250 und 300 g verwendet. Alle Tiere werden gemäß der EU-Richtlinien behandelt. Das Tierversuchsvorhaben ist gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-253-86-08) worden. Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen. Die Ratten werden in Gruppen von 2–3 Tieren in Standard Makrolon® Typ IV Käfigen bei einem künstlichen 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Als Einstreu dienen Weichholzfäsern (Altromin International, Laage). Die Reinigung der Käfige erfolgt wöchentlich. Pellets (Altromin International, Laage) und Wasser werden *ad libitum* bereitgestellt. Die Haltung der Ratten erfolgt in einem speziellen Tierstall mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55–65% und einer konstanten Raumtemperatur von 21–23°C. Die Tiere werden wöchentlich gewogen und täglich werden Putzverhalten, Aktivität, Automutilationszeichen und Zeichen für Infektionen oder Entzündungen beurteilt. Nach Lieferung wird den Tieren eine Eingewöhnungszeit von sieben Tagen vor Versuchsbeginn gewährt.

2.3.3 VERSUCHSMODELL UND ANATOMIE

Bei dem für die *in vivo* Versuche verwendeten epigastrischen Lappen, oder auch Leistenbeugelappen oder „groin flap“ handelt es sich um einen standardisierten frei transplantierbaren Hautlappen, der von den epigastrischen Gefäßen versorgt wird (OESTERWITZ *et al.* 2014). In der vorliegenden Studie wird dieser Lappen wie von STRAUCH UND MURRAY (1967) beschreiben als mikrovaskuläres Transplantat auf Basis der superfiziellen epigastrischen Gefäßen gehoben. Dieses Gefäßbündel besteht aus einer Arterie und einer Vene und versorgt die Haut und das subkutane Gewebe der Leistenbeuge sowie die unteren Zweidrittel des Abdomens (OESTERWITZ *et al.* 2014). Eine detaillierte Beschreibung des operativen Vorgehens findet sich in Kapitel 2.3.5.2.2 “Hebung des epigastrischen Lappens” ab Seite 51.

2.3.4 EVALUATIONSMETHODEN

2.3.4.1 Klinische Beobachtungen

Die Vitalität des Lappens wird während des gesamten Versuches engmaschig durch Beurteilung der Hautfarbe und des kapillären Refills klinisch evaluiert und die Beobachtungen schriftlich und photographisch (Nikon D700, Fa. Nikon Corp., Chiyoda, Tokyo, Japan) festgehalten.

2.3.4.2 Blutgasanalyse und laborchemische Untersuchungen

Die Blutgasanalyse (BGA) ist heute integraler Bestandteil der medizinischen Diagnostik und dient der Messung der Gasverteilung (Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck) sowie der Bestimmung des Säure-Base-Haushalts im Körper. Moderne Laboranalysegeräte erlau-

ben darüber hinaus die Bestimmung von Hämoglobinglobingehalt, Elektrolythaushalt, Metaboliten wie Glukose und Laktat und zahlreicher anderer Parameter.

Während der extrakorporalen Membranoxygenation von Gewebelappen im Tiermodell (Gruppe ECP) werden zu standardisierten Zeitpunkten laborchemische Untersuchungen durchgeführt: Das Probenmaterial für die Analysen wird unmittelbar nach Abnahme des Blutes für die Herstellung des Perfusats (Basiswert), sowie in 15–30 Minutenschritten während der achtstündigen Perfusion direkt aus dem Perfusat mit einer Kapillare entnommen und dem Analysegerät (RAPIDLAB® 348, Siemens Sector Healthcare, Erlangen) zugeführt. Folgende Parameter gehen in die spätere statistische Analyse ein: pH, Kalium (K^+), Sauerstoffsättigung (SO_2), Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), Bicarbonat-Puffer (HCO_3^-) und Hämoglobingehalt (Hb). Eine Glukose- und Laktatbestimmung ist aus technischen Gründen mit diesem Gerät nicht möglich.

2.3.4.3 Gewebe-Photospektrometrie

Die Gewebe-Photospektrometrie kombiniert zwei optische Techniken, die Weißlichtspektrometrie und die Laser-Doppler-Spektroskopie. Die technischen Grundlagen dieser Technik werden an anderer Stelle im Detail beschreiben (LOEFFELBEIN 2003; HÖLZLE *et al.* 2006; KRUG 2007) und sollen hier nur grob skizziert werden (Abb. 2.6).

Über eine Sonde wird sowohl Licht eines kontinuierlichen Spektrums (Weißlicht), als auch Licht einer spezifischen Wellenlänge (Laserlicht) in das Gewebe eingestrahlt. Als Weißlichtquelle dient eine Halogenlampe (21W). Das eingestrahlte Weißlicht wird zum einen an den Mitochondrien gestreut, wodurch sich Intensität und Wellenlänge des Lichts ändern. Zum anderen trifft das Licht auf Erythrozyten, deren Blutfarbstoffe (v.a. das Hämoglobin) in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung Licht absorbieren und damit zu einer Veränderung der Wellenlänge (und damit der Farbe) des Lichts führen. Die reflektierten Lichtstrahlen werden von einem Detektor ausgelesen und ermöglichen über die Messung von Wellenlängendifferenzen die Berechnung der Sauerstoffsättigung (SO_2) und über eine Absorptionsmessung die Bestimmung der relativen Hämoglobinkonzentration (Hb) (KRUG 2007).

Zur Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit (Velocity) und des Blutflussvolumens (Flow) macht sich die Technik den Doppler-Effekt zu Nutze. Der Doppler-Effekt geht auf den Physiker und Mathematiker C. J. Doppler zurück, der bereits 1842 das Phänomen beschrieb, dass sich die Frequenz einer Schallwelle durch die relative Bewegung von Schallquelle und Empfänger ändert. Bewegen sich Sender und Empfänger aufeinander zu kommt es zu einem Frequenzanstieg, im umgekehrten Fall zu zu einem Frequenzabfall. Bewegen sich Sender und Empfänger relativ zueinander nicht, so tritt kein Doppler-Effekt auf (LOEFFELBEIN 2003). Bei der Laser-Doppler-Spektroskopie ändert sich die Wellenlänge von in das Gewebe einge-

strahltem Laserlicht durch sich bewegende Erythrozyten. Der Frequenzunterschied (Doppler-Shift) ermöglicht die Berechnung der Fließgeschwindigkeit und des Flussvolumens der Erythrozyten (KRUG 2007).

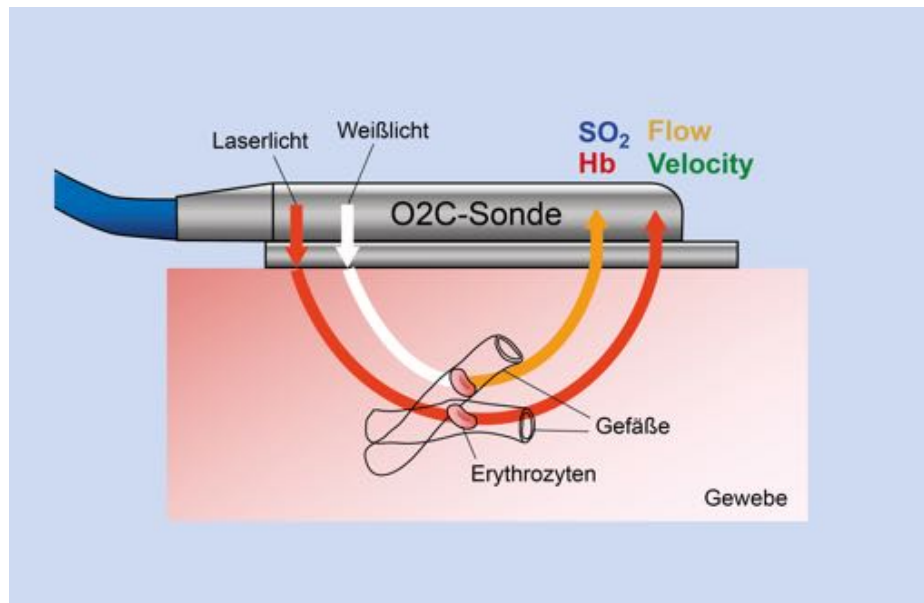


Abb. 2.6 Funktionsweise der Gewebe-Photospektrometrie. Von einer Sonde wird sowohl Weißlicht als auch gebündeltes Licht (Laser) in das Gewebe eingestrahlt. Mitochondrien führen zu einer Streuung des Lichts, wodurch sich die Ausbreitungsrichtung und Intensität des Lichts ändert. Das in Erythrozyten gespeicherte Hämoglobin absorbiert in Abhängigkeit von dessen Sauerstoffsättigung Licht und führt zu einer Änderung der Wellenlänge und damit der Farbe des Lichts. Das reflektierte Licht wird durch Detektoren in der Sonde wiederaufgefangen und dient zur Berechnung der Sauerstoffsättigung und der relativen Hämoglobinkonzentration. Zur Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit (Velocity) und des Blutflussvolumens (Flow) macht sich die Technik den Umstand zu Nutze, dass sich die Wellenlänge des in das Gewebe eingestrahlt Laserlichts durch fließende Erythrozyten ändert (Doppler-Effekt). Modifiziert und vereinfacht nach KRUG (2007).

Das O2C (oxygen to see)-Gerät (LEA Medizintechnik GmbH, Giessen) kombiniert diese beiden Techniken und dient in der vorliegenden Arbeit der noninvasiven Bestimmung der Parameter SO_2 , Hb, Velocity und Flow. Die Einheiten der Parameter Hb, Velocity und Flow werden in arbiträren Einheiten (*engl.* „arbitrary units“, AU) angegeben. SO_2 wird in Prozent angegeben. Die Messungen erfolgten mit einer 2+2 Kanal LF-2 Flachsonde mit einem übertragbaren Wellenlängenbereich von 500–850 nm (LEA Medizintechnik GmbH, Giessen).

O2C-Messungen werden zu standardisierten Zeitpunkten in den Gruppen K1, K3 und ECP durchgeführt (Abb. 2.5). In Gruppe K1 werden O2C-Messungen abweichend von den anderen Versuchsgruppen nur präoperativ, d.h. vor dem Hautschnitt (Basiswert) und am siebten postoperativen Tag erhoben. In Gruppe K2 erfolgen die Messungen präoperativ, nach Hebung des Lappens, nach Wundverschluss sowie am siebten postoperativen Tag vor Euthanasie des Versuchstiers. In den Gruppen K3 und ECP werden zusätzliche Messungen unmittelbar nach Beginn des achtstündigen Perfusionsintervalls, in 30-minütlichen Intervallen wäh-

rend der Perfusion sowie nach Transferierung des Lappens auf das Empfängertier durchgeführt. Alle Messungen werden (1) im kranialen Drittel, (2) im Zentrum und (3) im kaudalen Drittel des Lappens unter konstantem Druck und konstanten Lichtverhältnissen erhoben.

2.3.4.4 Indocyanin-Grün Fluoreszenzangiographie

Bei der Fluoreszenzangiographie handelt es sich um ein noninvasives bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Gefäßen sowie zur qualitativen und – mit Hilfe einer entsprechenden Software – quantitativen Beurteilung der Gewebedurchblutung. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff, in unserem Fall das Indocyanin-Grün (ICG, Abb. 2.7), in die Blutbahn injiziert und in dem zu untersuchenden Areal mit Hilfe einer Lichtquelle (Nah-Infrarotbereich, Wellenlänge 800 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Da sich der Spektralbereich der Lichtemission von dem des Anregungslichts unterscheidet, lässt sich letzteres über spezielle Filter blockieren, während das emittierte Fluoreszenzsignal detektiert wird (HOLM *et al.* 2010; MÜCKE *et al.* 2010a; MÜCKE 2012). Ursprünglich als Farbstoff für die Fotografie entwickelt, beschrieben FOX *et al.* im Jahre 1956 die Anwendung von ICG zur kardiologischen Diagnostik und hoben dabei vor allem die Unabhängigkeit des Messverfahrens von Hämoglobingehalt und Sauerstoffsättigung hervor. Heute findet die ICG-Fluoreszenzangiographie breite Anwendung in der Leberfunktionsdiagnostik, Ophthalmologie, Neurochirurgie, Gefäßchirurgie (z.i. MÜCKE 2012) und zunehmend auch in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie zur Beurteilung von Mikroanastomosen und zur Perfusionsdiagnostik freier Gewebetransplantate (GIUNTA *et al.* 2005; HOLM *et al.* 2010; MÜCKE *et al.* 2010a). So sind mit Hilfe der ICG-Angiographie bereits intraoperativ Aussagen über die Erfolgswahrscheinlichkeit eines Gewebetransplantats möglich (GIUNTA *et al.* 2005).

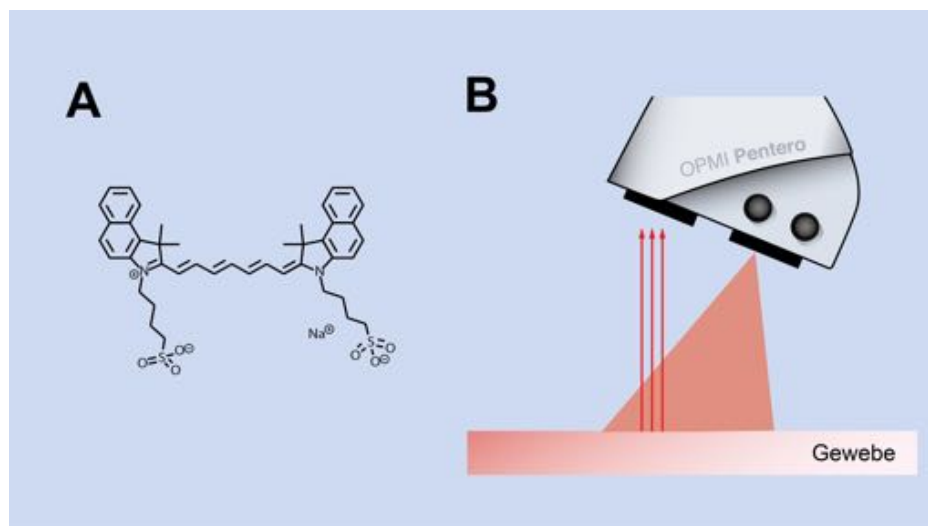


Abb. 2.7: Funktionsweise Indocyanin-Grün Fluoreszenzangiographie. (A) Strukturformel des Indocyanin-Grün Fluoreszenzfarbstoffs (ICG); (B) Stark schematisierte Darstellung des Funktionsprinzips der ICG-Fluoreszenzangiographie.

Für die Fluoreszenzangiographie wird zunächst der Fluoreszenzfarbstoff (Indocyanin-Grün 25 mg, ICG-PULSION[®], Fa. Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen), entsprechend den Herstellerangaben zubereitet. Hierzu werden 25 mg ICG Pulver (entspricht einem handelsüblichen Fläschchen) in 5 ml Aqua ad iniectabilia (Wasser für Injektionszwecke, Ampuwa[®], Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.) aufgelöst.

Unmittelbar vor der Messung werden dem Versuchstier 0,5 mg/kg KGW des Farbstoffgemischs über die Schwanzvene oder Femoralvene injiziert und ca. 0,5 ml Ringer-Lösung (Fa. DeltaSelect, Dreieich) nachgespült oder in der gleichen Dosierung dem Perfusat beigemischt. Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals erfolgt entweder mit Hilfe der integrierten FLOW[®] 800 Funktion des OP-Mikroskops (Zeiss Pentero[®] Operationsmikroskop mit FLOW[®] 800 Option, Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen) oder mit einer mobilen Nahinfrarot-Fluoreszenzkamera (PDE Photodynamic Eye, Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen). Bei Verwendung der mobilen Kamera werden die aufgezeichneten Videodaten über einen Medienwandler (Pinnacle Video Transfer 8241, Fa. Avid Technology Inc., Burlington, MA, USA) in das Videodateiformat .MP4 konvertiert und auf einen USB-Stick gespeichert. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgt bei Verwendung der integrierten FLOW[®] 800 Option unmittelbar im Anschluss an die Messung mit Hilfe der FLOW[®] 800 Software (Version 2.6, Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen). Wird die mobile photodynamische Kamera verwendet, so wird für die Datenanalyse die Software IC-CALC (Version 2.0, Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen) herangezogen.

Die ICG-Messungen werden in Gruppe ECP unmittelbar nach Legung des venösen Katheters, aber vor Hebung des epigastrischen Lappens (Basiswert), nach Beginn der Perfusion des epigastrischen Lappens sowie am 7. postoperativen Tag vor Euthanasie des Versuchstiers erhoben. Das Fluoreszenzsignal wird jeweils über einen Zeitraum von drei Minuten aufgezeichnet.

2.3.4.5 Planimetrische Vermessung der Nekrosezone

Die Fotodokumentation erfolgt mit einer im rechten Winkel zum OP-Feld ausgerichteten, auf einem Stativ montierten digitalen Spiegelreflexkamera (Typ Nikon D700, Fa. Nikon Corp., Chiyoda, Tokyo, Japan).

Die planimetrische Vermessung der Nekrosefläche wird mit Hilfe der „open souce“ Software ImageJ (RASBAND 1997-2009) durchgeführt. Die am 7. postoperativen Tag aufgenommenen digitalen Photographien der epigastrischen Lappen werden im TIFF-Format auf einem Datenträger gespeichert (WD Green WD20EZR 2 TB Festplatte, Western Digital Corp., Lake Forest, CA, USA) und in die ImageJ Software geladen. Die Software erfasst neben der Gesamtpixelzahl des Bildes die Pixelzahl manuell ausgewählter Bereiche und ermöglicht so die

Berechnung von Flächen. Hierzu wird mit einem Grafiktablett und dazugehörigem Eingabestift (Wacom Intuos® 3 Grafiktablett, Wacom Co., Ltd., Saitama, Japan) auf dem Bild zunächst der Gesamtumriss des epigastrischen Lappens und anschließend die klinisch eindeutig nekrotischen Areale umfahren. Die von der ImageJ Software angegebenen Pixelzahlen werden für die weitere Berechnung der Flächen bzw. Flächenverhältnisse in eine Tabelle eingetragen (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Da für die vorliegende Arbeit absolute Flächenwerte nicht von Interesse sind, beschränken sich die weiteren Berechnungen auf das Verhältnis der Pixelzahlen. Die Nekroserate ergibt sich aus dem Verhältnis Pixelzahl des nekrotischen Areals/ Pixelzahl des gesamten umfahrenen Lappenumrisses x 100 in Prozent. Die Vermessung der Bilder wird von zwei Untersuchern durchgeführt. Für die spätere statistische Analyse werden die Mittelwerte der von den beiden Untersuchern erhobenen Werte herangezogen. Um ein untersucherabhängiges Bias zu vermeiden, werden die digitalen Dateien zudem vor der Analyse durch einen unabhängigen Anwender „verblindet“, indem sie so umbenannt wurden, dass der Untersucher keinen Rückschluss auf das Versuchstier bzw. die Studiengruppe ziehen kann.

2.3.4.6 Gewebeentnahme und Strukturelle Untersuchungen

Nach Euthanasie des Versuchstiers am siebten postoperativen Tag (siehe Seite 50) wird der epigastrische Lappen der Ratte wie in Kapitel 2.3.5.2.2 auf Seite 51 beschreiben gehoben, der Gefäßstiel durchtrennt und der Lappen *in toto* entnommen und 24 Stunden lang in 2,5%iges Glutaraldehyd (AppliChem GmbH, Darmstadt) getaucht. Im nächsten Schritt werden die Proben in 0,1 M Soerensen's Phosphatpuffer (pH 14) gewaschen und anschließend in 1 % Osmium Lösung (1,0 g OsO₄ in 50 ml *aqua bideest.* nach CAULFIELD 1957) fixiert. Anschließend erfolgt die Dehydratation in einer mehrstufigen aufsteigenden Alkoholreihe. Die dehydrierten Proben werden anschließend in Epoxidharz eingebettet und bei ca. 60°C für zwei Tage in einem Brutschrank gelagert. Von allen Präparaten werden Semidünnschnitte (0,5 µm) für die lichtmikroskopischen Untersuchungen hergestellt und die Schnitte auf Triethoxysilan-beschichteten Objektträger aufgebracht, auf einer Heizplatte bei 85°C getrocknet und flammenfixiert.

Zur Beurteilung des strukturellen Aufbaus, der zellulären Morphologie und der Vaskularisierung werden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Das Färbeprotokoll ist in der Liste der verwendeten Materialien und Geräte ab Seite 59 aufgeführt. In der HE-Färbung erscheinen Zellkerne blauviolett, Zytoplasma und zellarmes Bindegewebe werden hellrot dargestellt. Die Beurteilung der Präparate erfolgt in 20 bis 100-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiovert 100® , Fa. Zeiss, Jena) mit Öl-Immersions-Objektiv (NEO PLAN, 2x, 10x, n.A. 1.25, Fa. Zeiss, Jena).

2.3.5 OPERATIVE METHODEN

2.3.5.1 perioperative Vorkehrungen, Anästhesie und Euthanasie

2.3.5.1.1 Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie

Nach einer Allgemeinuntersuchung erfolgt die Einleitung der Anästhesie der 250–300 g schweren Nager durch Isofluran-Kurzarkose (Fa. Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA) in einer Ganzkörperkammer und anschließende intraperitoneale Kombinationsanästhesie aus Ketamin 100mg/kg KGW (Narketan[®], Fa. Vétoquinol GmbH, Ravensburg) und Xylazin 5 mg/kg KGW (Rompun[®], Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in einer Mischspritze. Nach angemessener Wartezeit wird die Narkosetiefe mit Hilfe von Korneal- und Flexorenreflex überprüft. Nach großzügiger Nassrasur des Abdominalbereichs werden die Tiere mit Papiertüchern getrocknet, um ein Auskühlen zu vermeiden und anschließend die Gliedmaßen mit Pflasterstreifen auf einer mit einer sterilen Unterlage (Raucodrape[®] 38 x 45 cm, Fa. Lohmann & Rauscher GmbH und Co. KG, Rengsdorf) belegten handelsüblichen Korkplatte fixiert. Um die Versuchstiere auch im weiteren Verlauf normotherm zu halten, werden diese während der gesamten Narkose auf einer Heizmatte (Fa. Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC, Canada) gelagert. Die Desinfektion des Operationsgebietes erfolgt mit Propran-2-ol Spray (Cutasept[®] F, Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim). Über einen Konus wird dem Tier pernasal reiner Sauerstoff substituiert. Die Keratitisprophylaxe erfolgt mit Dexpanthenol-haltiger Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Roche, Genzach-Wyhlen). Während des gesamten Narkoseverlaufs erfolgt eine kontinuierliche Überwachung der Vitalwerte durch klinische Beobachtung, Messung der Temperatur und Monitoring der Pulsfrequenz mit Hilfe eines Highspeed-Pulsoximeters (Fa. mediquip Medizintechnik, Kirchzarten).

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie wird durch langsame intravenöse Gabe von Ketamin 33 mg/kg KGW und Xylazin 1,6 mg/kg KGW über eine Mischspritze etwa alle 30 Minuten unter kontinuierlicher Kontrolle der Vitalparameter erreicht. Sollte in Einzelfällen eine Nachdosierung der Narkose vor erfolgter Lage eines peripher- bzw. zentralvenösen Venenkatheters erforderlich werden, so erfolgt dies durch intraperitoneale Gabe der halben Initialdosis des Ketamin/ Xylazin-Gemischs. Die ausreichende Versorgung mit Flüssigkeit wird durch die Gabe von ca. 5 ml Ringer-Lösung i.v. (Fa. DeltaSelect GmbH, Dreieich) über den gesamten OP-Verlauf sichergestellt.

2.3.5.1.2 Nachbehandlung

Unmittelbar postoperativ werden den Tieren drei Tropfen Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm 1[®], Fa. ratiopharm, Ulm) p.o. zur postoperativen Analgesie verabreicht sobald der Schluckreflex wieder eingesetzt hat. Nach dem vollständigen Erwachen erfolgt die weitere Schmerztherapie mit Hilfe von Buprenorphin (Temgesic[®], Fa. Essex Pharma, München) 0,015 mg/12 h s.c. über zwei Tage. Anschließend werden die Tiere für ca. drei Stunden unter eine Rotlichtlampe gesetzt, um einen narkosebedingten Wärmeverlust auszugleichen. Erst dann werden die Tiere wieder in die ursprüngliche Käfiggruppe zurück gesetzt, wo ihnen sofort wieder Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung stehen.

In den folgenden sieben Tagen werden die Tiere täglich visitiert, gewogen und auf Putzverhalten, Mimik, Automutilationszeichen und Infektzeichen hin untersucht. Auffälligkeiten werden in einem standardisierten Protokoll vermerkt.

2.3.5.1.3 Euthanasie der Versuchstiere

Nach Beendigung der Versuche am siebten postoperativen Tag erfolgt die Euthanasie der Versuchstiere in tiefer Narkose (siehe Seite 49) durch lethale intravenöse Pentobarbitalinjektion (Dosierung 60 mg/kg KGW, Narcoren[®], Fa. Merial GmbH, Halbergmoos) über den vorhandenen Katheter und anschließendes Ausblutenlassen durch Eröffnung der Bauchaorta.

2.3.5.2 Operatives Vorgehen

2.3.5.2.1 Venöse Katheterisierung

Nach Kontrolle der Narkosetiefe, Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes und Lagerung des Versuchstiers wird zunächst ein venöser Zugang gelegt. Dies ermöglicht einerseits eine komplikationsarme Aufrechterhaltung der Narkose sowie die Möglichkeit der i.v.-Gabe von Pharmakologika (Flüssigkeitssubstitution, Fluoreszenzangiographie). In der Regel erfolgt dies über eine Punktion der Schwanzvene. Hierzu wird das Tier zunächst wieder in Seitenlage gedreht und der Schwanz in handwarmen Wasser, unter Verwendung von etwas Seife gereinigt. Anschließend werden die beiden latero-kaudal liegenden Schwanzvenen durch Anlegen eines handelsüblichen Gummibands gestaut. Das distale Drittel des Schwanzes wird mit Cutasept[®] F Spray desinfiziert und anschließend eine der beiden Venen mit einer 24 Gauge Katheter (Insyte-WTM 24 G 0,7 x 19 mm, Fa. Becton Dickinson AG, Franklin Lakes, New Jersey, USA) punktiert. Die Nadel wird zurückgezogen und der Katheter mit Klebestreifen am Schwanz befestigt, um eine Dislokation zu vermeiden. Die Lage des Katheters wird durch visuelle Kontrolle auf ausfließendes venöses Blut aus dem Katheter und durch anschließende langsame Gabe von ca. 0,5 ml Ringer-Lösung über den Katheter kontrolliert.

Mißlingt der Versuch der Schwanzvenenpunktion, so wird zunächst ein weiterer Punktionsversuch an der gleichen Vene ca. 1 cm proximal der ersten Punktionsstelle durchgeführt. Mißlingt auch dieser Versuch, so wird zur Vermeidung einer Schwanznekrose auf die Punktion der rechten V. femoralis ausgewichen. Die fehlliegenden Katheter werden entfernt und die punktierte Vene manuell komprimiert, bis keine Blutung aus dem Gefäß mehr zu beobachten ist. Nun wird das Tier wieder in Rückenlage positioniert und der rechte Hinterlauf des Versuchstiers mit einem Klebestreifen in Adduktionsstellung auf der Unterlage fixiert. Nach erneuter Kontrolle der Narkosetiefe wird die Haut über der Leiste über eine Länge von ca. 1 cm mit einem Skalpell inzidiert, die Bauchdecke nach medial retrahiert und das Femoraldreieck aufgesucht, das sich zwischen Ligamentum inguinale, Extensormuskeln und Adduktoren aufspannt. Im nächsten Schritt werden Arteria und Vena femoralis, die das Femoraldreieck durch den Femoralkanal erreichen, unter Zuhilfenahme eines OP-Mikroskops (Zeiss OPMI[®] pico Operationsmikroskop, Fa. Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen) aufgesucht und die Vene über eine Länge von ca. 1 cm unter sorgfältiger Schonung ihrer Abgänge freipräpariert. Das freipräparierte Areal der V. femoralis wird nun distal des Abgangs der V. femoralis profunda mit je einem temporären Gefäßclip nach proximal bzw. distal abgeklemmt und über eine punktförmige Stichinzision ein kleinlumiger neonatologischer Venenkatheter (Nutraline 2 Fr 0,3 x 0,6 mm, Fa. Vygon, Écouen, Frankreich) bis in die V. cava inferior vorgeschoben.

2.3.5.2.2 Hebung des epigastrischen Lappens

Der epigastrische Lappen der Ratte wird wie von STRAUCH UND MURRAY (1967) beschrieben gehoben. Zunächst werden mit einem wasserfesten Stift die Lappengrenzen 4 x 7 cm, mit Hilfe einer Schablone eingezeichnet (Abb. 2.8A). Die Schablone wird dabei entlang der Längsachse des Tiers positioniert und so ausgerichtet, dass die nach medial gerichtete Schablonekante leicht mittellinienüberschreitend zu liegen kommt. Die basale Lappengrenze wird knapp unterhalb des angenommenen Verlaufs des Leistenbandes gewählt. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz (III²) wird mit der basalen Schnittführung begonnen und, analog wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, zunächst das Femoraldreieck und die Femoralgefäße aufgesucht. Arteria und Vena femoralis werden über eine Länge von ca. 2 cm mit Mikroinstrumenten freipräpariert. Im unteren Winkel des Femoraldreiecks finden sich die Abgänge der superfiziellen epigastrischen Gefäße, die in einem bogenförmigen Verlauf im inguinalen Fettgewebe nach kranial verlaufen, und die Haut, sowie das subkutane Gewebe der Leistenbeuge und der unteren Zweidrittel des Abdomens versorgen (OESTERWITZ *et al.* 2014). Diese Gefäße werden, ausgehend von Ihren Stammgefäßen, über eine Länge von ca. 0,5 mm schonend separiert (Abb. 2.9B und 2.10A). Anschließend wird die Hautinsel entsprechend der Anzeichnung vollständig umschnitten und unter Einbeziehen

des Panniculus carnosus von der Bauchwand abgehoben (Abb. 2.8B), wobei sämtliche Perforatoren aus dem tiefen epigastrischen System elektrokauterisiert (Erbotom ICC 350, Fa. Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen) und durchtrennt werden. Auf dieser Weise wird der Hautlappen unter Schonung des Gefäßstiels vollständig gehoben und nach kaudal geschlagen (Abb. 2.8C).

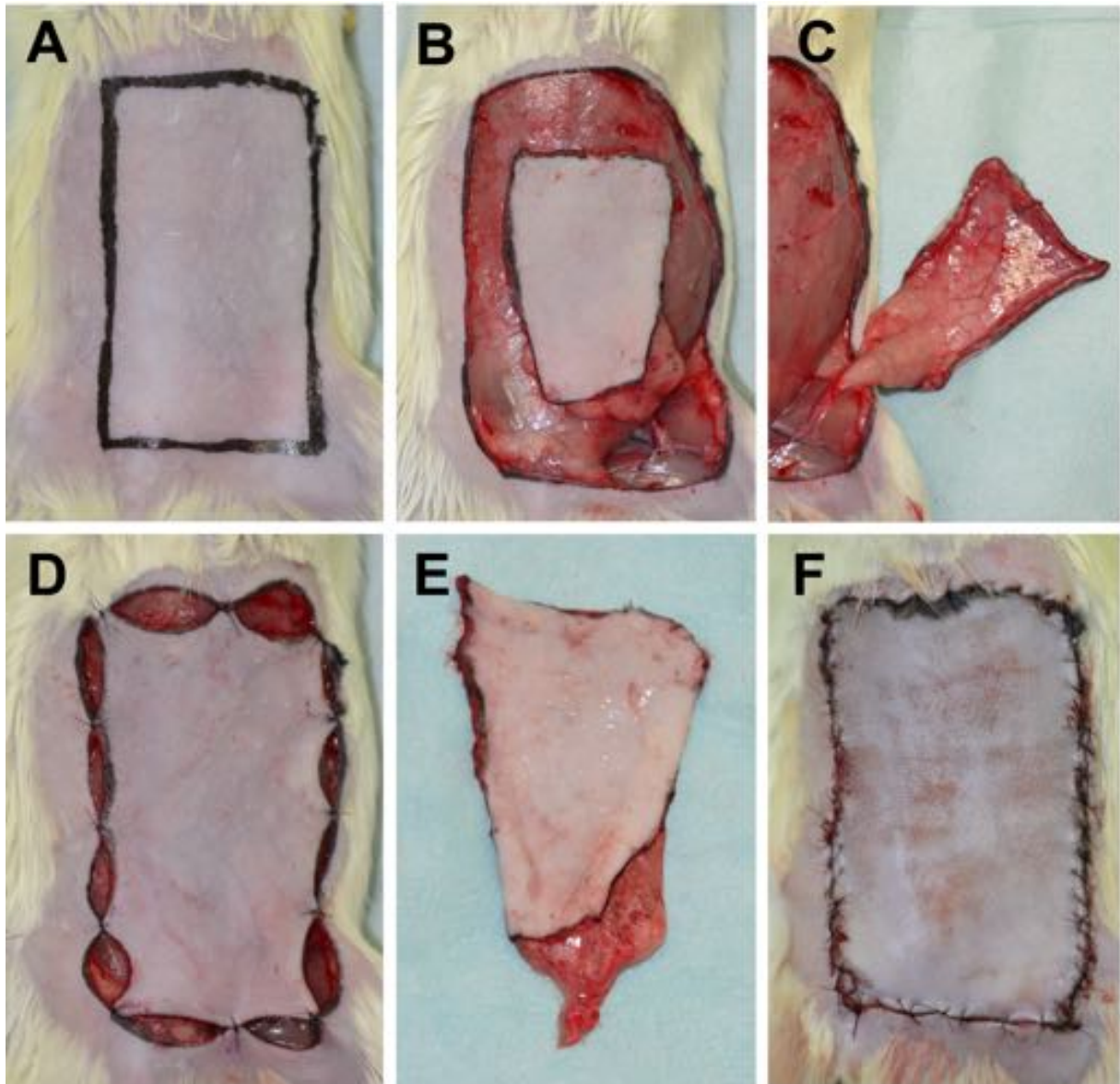


Abb. 2.8: Hebung des epigastrischen Lappens der Ratte. (A) Anzeichnen der Lappengrenzen 4 x 7 cm, (B) Umschneiden der Hautinsel und Darstellen des epigastrischen Gefäßbündels, (C) Vollständig gehobener und zur Seite geschlagener epigastrischer Lappen, (D) Für den Zeitraum der Perfusion temporär ins Wundbett zurückgeschlagener und provisorisch fixierte Hautinsel, (E) Abgesetzter epigastrischer Lappen mit Gefäßstiel, (F) Auf ein anderes Tier transferierter, mikroanastomosierter Lappen nach Einnähen der Hautinsel.

2.3.5.2.3 Wundverschluss

Der Wundverschluss erfolgt einschichtig mit monofilem Nahtmaterial (Ethilon 6-0, Fa. Ethicon, Norderstedt) in fortlaufender Technik. Um ein Ausbeißen der Fäden zu erschweren, werden in ca. 1 cm Abständen zusätzliche Einzelknopfnähte als „Stopp-Nähte“ eingefügt

(Abb. 2.8F). Abschließend wird das OP-Gebiet gereinigt und das Tier bis zum vollständigen Abklingen der Narkose unter einer Wärmelampe zurück in einen Einzelkäfig gesetzt.

2.3.5.2.4 Kontrollgruppe 1 – Sham Operation

In Gruppe K1 wird der epigastrische Lappen, wie oben beschrieben, vollständig gehoben (Abb. 2.8C). Femoralisgefäße und epigastrische Gefäße werden einzeln schonend freipräpariert, bleiben jedoch intakt. Im Anschluss an das Heben wird der Lappen wieder zurück in das Wundbett genäht (Ethilon® 6-0, Fa. Ethicon, Norderstedt) und die Narkose beendet. Ziel dieser „Positivkontrolle“ ist es, zu zeigen, dass der Versuchsaufbau funktioniert. Präziser ausgedrückt, dass der epigastrische Lappen in den verwendeten Größendimensionen, nach vollständiger Hebung und damit verbundener Druchtrennung aller Perforatoren, allein durch die epigastrischen Gefäße gespeist, einheilen kann.

2.3.5.2.5 Kontrollgruppe 2 – Acht Stunden ohne Perfusion

In Gruppe K2 wird der epigastrische Lappen, wie oben, beschrieben gehoben (Abb. 2.8C). Anschließend wird der Lappen mit dem epigastrischen Gefäßbündel und einem ca. 4 mm langen Abschnitt der Femoralisgefäße im Bereich der Einmündung der epigastrischen Gefäße, wie in Abbildung 2.9B und C, abgesetzt. Abbildung 2.8E zeigt den vollständig abgesetzten Lappen. Distaler und proximaler Stumpf der Femoralisgefäße werden hierzu ligiert (Ethilon® 9-0, Fa. Ethicon, Norderstedt). Um eine Austrocknung des Lappens zu vermeiden, wird dieser anschließend mit einigen Hautnähten (Ethilon® 6-0, Fa. Ethicon, Norderstedt) zurück in das Wundbett genäht (Abb. 2.8D), wobei das Gefäßbündel im Bereich der Leiste zu liegen kommt und vollständig von Flüssigkeit (Ringer-Lösung, DeltaSelect, Dreieich) bedeckt wird. Es wird nun ein achtstündiges Ischämieintervall abgewartet. Die Narkose des Versuchstiers wird über diesen Zeitraum aufrechterhalten. Nach knapp acht Stunden wird ein zweites Tier (Empfänger) narkotisiert und der epigastrische Lappen der linken Seite wie oben beschrieben gehoben, abgesetzt und verworfen. Am Spendertier werden die Hautnähte des rückverlagerten epigastrischen Lappens gelöst und Letzterer auf das Empfängertier transferiert. Es folgt die mikrochirurgische Anastomosierung der Lappengefäße an die Femoralisgefäße des Empfängertiers und die Freigabe des Blutstroms (Abb. 2.9E und 2.10C). Abschließend wird die Hautinsel des Transplantats zurück in das Wundbett genäht (Ethilon® 6-0, Fa. Ethicon, Norderstedt). Hypothese dieser „Negativkontrolle“ ist es, zu prüfen, ob eine Ischämiezeit von mehr als acht Stunden für einen dünnen „composite flap“, wie den epigastrischen Lappen, der Ratte zu lang ist, um eine Einheilung zu ermöglichen.

2.3.5.2.6 Kontrollgruppe 3 – Acht Stunden *in vivo* Perfusion

Analog zur ersten Kontrollgruppe wird auch in dieser Kontrollgruppe (K3) der epigastrische Lappen vollständig, wie oben beschrieben, gehoben, von der Bauchwand abgehoben und

wieder mit einzelnen Fixationsnähten im Wundbett fixiert. Nach Freipräparation der femoralen und epigastrischen Gefäße werden diese wie in Gruppe K2 zunächst ebenfalls nicht abgesetzt. Der epigastrische Lappen wird über einen Zeitraum von acht Stunden über die superfiziellen epigastrischen Gefäße perfundiert. Während dieser Zeit wird die Narkose aufrecht erhalten. Nach knapp acht Stunden wird ein zweites Tier (Empfänger) narkotisiert und auch bei diesem Tier der epigastrische Lappen der linken Seite, wie oben beschrieben, gehoben, abgesetzt und verworfen. Im Anschluss an die achtstündige *in vivo* Perfusion wird nun der Lappen mit einem ca. 4 mm langen Segment der femoralen Gefäße abgesetzt und das Tier euthanasiert. Das entnommene Transplantat wird, wie in den Abbildungen 2.9D und E dargestellt, auf das Empfängertier transferiert.

2.3.5.2.7 Extrakorporale Perfusion des epigastrischen Lappens

Das operative Vorgehen ist analog zu dem der Kontrollgruppe 3. Statt einer achtstündigen *in vivo* Perfusion wird das Transplantat jedoch über den selben Zeitraum über das oben beschriebene ECP-System perfundiert. Hierzu werden A. und V. femoralis unmittelbar hinter dem Abgang der tiefen Femoralgefäße unterbunden und abgesetzt (Abb. 2.9).

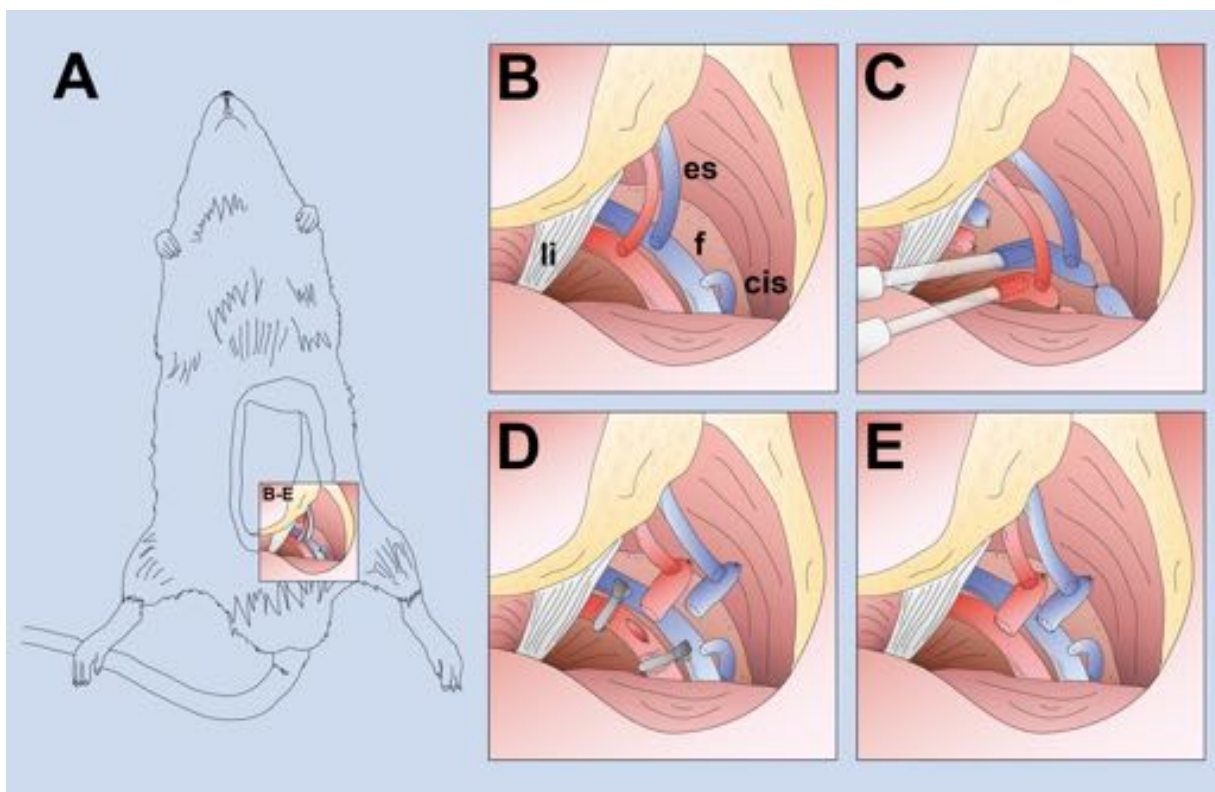


Abb. 2.9: Systematik des operativen Eingriffs, Schemazeichnung. (A) Überblicksbild, (B–E) Detailbilder aus der Inguinalregion, (li) Ligamentum inguinale, (f) Femoralgefäße, (es) Arteria und Vena epigastrica superficialis, (ci) Vena circumflexa iliaca superficialis. (B) OP-Situs nach Darstellung der femoralen und epigastrischen Gefäße, (C) Kanülierung von A. und V. femoralis nach proximaler und distaler Ligatur, (D) Transfer des Lappens auf ein Empfängertier und End-zu-Seit Anastomose der Femoralgefäße an die Femoralgefäße des Empfängertiers, (E) Situs nach erfolgter Mikroanastomose.

Auf die distalen Gefäßstümpfe wird je ein temporärer Gefäßclip aufgebracht. Nun werden nacheinander A. femoralis und V. femoralis mit einem peripheren Venenkatheter (Vasofix® Braunüle® 20 G (rosa) und 18 G (grün), Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) kanüliert und mit dem Perfusionssystem verbunden (Abb. 2.9C und 2.10A). Um eine Dislokation der Kanülen zu vermeiden, werden diese mit einer Ligatur (Ethilon® 9-0, Fa. Ethicon, Nordestedt) am Gefäß befestigt. Anschließend wird die Pumpe gestartet und das Transplantat über einen Zeitraum von acht Stunden perfundiert. Details zur extrakorporalen Perfusion und zur Perfusatzusammensetzung werden im Kapitel 2.3.6 "Perfusionsprotokoll" ab Seite 56 erläutert. Nach knapp acht Stunden wird ein zweites Tier (Empfänger) narkotisiert und der epigastrische Lappen der linken Seite wie oben beschrieben gehoben, abgesetzt und verworfen. Nach Abschluss des Perfusionsintervalls wird das Transplantat analog zu Kontrollgruppe 3 auf ein Empfängertier transferiert (Abb. 2.9D und E); das Spendertier wird euthanasiert.

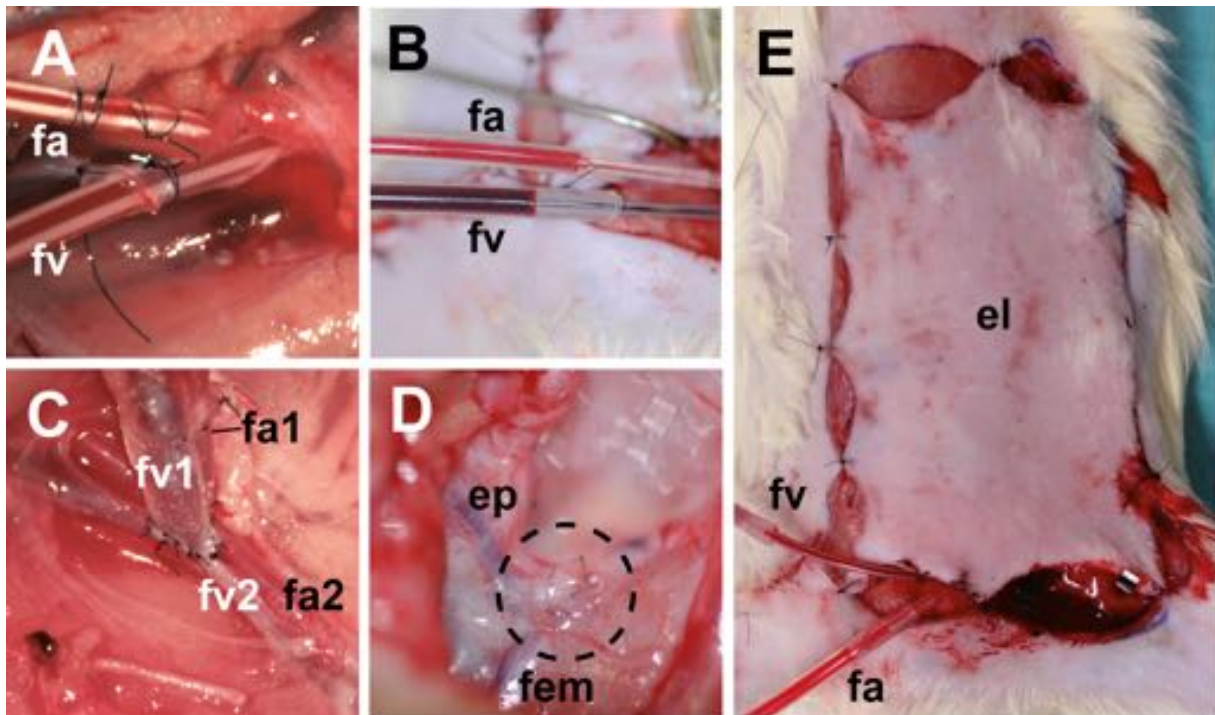


Abb. 2.10: Operatives Vorgehen im Tiermodell. (A) Detailbild der kanülierten Femoralisgefäße. (B) Deutlich zu sehen ist der Farbunterschied zwischen arterialisiertem (fa) und deoxygeniertem venösem Blut (fv). (C) Zustand nach erfolgter Anastomosierung der Lappengefäße (fv1, fa1) auf die Femoralisgefäße eines zweiten Versuchstiers (fv2, fa2) nach achtstündiger extrakorporaler Perfusion. (D) Anastomoseregion eines erfolgreich eingewundenen epigastrischen Lappens am 7. postoperativen Tag, (ep) Epigastrische Gefäße, (fem) Femoralisgefäße. (E) Vollständig gehobener und wieder im Wundbett fixierter epigastrischer Lappen der Ratte (el), der über A. femoralis (fa) und V. femoralis (fv) mit dem extrakorporalen Perfusionssystem verbunden ist.

Nach Einnähen der oberen Zweidrittel der Hautinsel werden die Gefäßanastomosen in den Versuchsgruppen K2, K3 und ECP erneut unter dem Mikroskop inspiziert und sind bei allen Tieren weiterhin durchgängig.

2.3.6 PERFUSIONSPROTOKOLL

2.3.6.1 Vorbereitung des Perfusionssystems

Etwa 30 Minuten vor Beginn der Gewebepfusion wird das Schlauchsystem mit heparinversetzter Ringer-Lösung gespült.

Ringer-Lösung	10 ml
Heparin-Natrium	100 IE

Dazu werden arterieller und venöser Schenkel des noch unbefüllten Schlauchsystems mit Lueranschlüssen über einen Dreiwegehahn konnektiert und auf diese Weise ein geschlossener Kreislauf konstruiert. Die Reservoirs des Perfusionssystems werden mit heparinversetzter Ringer-Lösung befüllt und die Pumpleistung auf 5 ml/min eingestellt.

2.3.6.2 Zusammensetzung des verwendeten Perfusats

Das verwendete Perfusat besteht zu gleichen Teilen aus vollheparinisiertem Mischvollblut und einer im Verhältnis 3:1 angesetzten Kombination aus Ringer-Lösung und sechsprozentiger Hydroxyethylstärke (HES, Volulyte 6%, Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.):

murines Vollblut	5* ml
Ringer-Lösung	2 ml
HES 6%	1 ml
Heparin-Natrium	10 IE/ml Vollblut

* Um die Anzahl notwendiger Versuchstiere möglichst gering zu halten wird immer die maximale entnehmbare Menge Blut für die Herstellung des Perfusats verwendet. Um Diskrepanzen in der Perfusatzusammensetzung zu minimieren, wird darauf geachtet das Verhältnis Vollblut/ (Ringer-Lösung + HES) konstant zu halten.

2.3.6.3 Blutentnahme Ratte

Das für die Herstellung des Perfusats verwendete arterielle und venöse Vollblut entstammt dem Versuchstier, das als Spendertier für die Lappenentnahme dient sowie weiteren Spendertieren, die ausschließlich für die Blutgewinnung verwendet werden. Die Blutentnahme erfolgt nach vollständiger Hebung des epigastrischen Transplantats, aber noch vor Absetzen und Kanülierung des Gefäßstiels. Das Versuchstier befindet sich in tiefer Narkose und ist in supiner Lage positioniert. Über eine mediane Schnittführung entlang des Abdomens wird die Bauchdecke dargestellt. Dieser Schritt entfällt bei Spendertieren, bei denen bereits der epigastrische Lappen gehoben wurde. Die Linea alba wird aufgesucht und über eine Länge von ca. 3 cm scharf eröffnet. Die Baueingeweide werden zur Seite gedrängt und die retroperi-

tonealen großen Gefäße aufgesucht und mit Stieltupfern vorsichtig separiert. Die Aortenbifurkation wird aufgesucht und mit einer Dünnwand-Kanüle (Sterican[®], 21 G, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) flach von kaudal anpunktiert. Das aortale Vollblut wird in eine 5 ml Spritze aufgezogen, die mit 50 IE Heparin, gelöst in 0,5 ml Ringer-Lösung, gefüllt ist. Zeitgleich wird über den vorhandenen venösen Katheter venöses Vollblut gewonnen, wobei hier die entnehmbaren Mengen wesentlich geringer sind. Das Gesamtblutvolumen von Ratten liegt bei 54–70 ml/kg KGW (WOLFENSOHN UND LLOYD 2003). Das entspricht 16,2–21 ml bei einem 300 g schweren Nager. Die Gesamtmenge des entnehmbaren Blutes liegt zwischen 5 und 7 ml abhängig vom Körpergewicht. Der Vorgang der Blutentnahme erfolgte in tiefer Narkose, dauert weniger als eine Minute und endet mit dem raschen, schmerzlosen Tod des Versuchstiers im hypovolämischen Schock. Auf eine zusätzliche Gabe eines hochdosierten Barbituratpräparats wird bei diesen Tieren zugunsten der Vermeidung von Verunreinigungen des Perfusats verzichtet.

2.3.6.4 Voreinstellungen des Systems und extrakorporale Perfusion

Nach Herstellung des Perfusats wird die heparinversetzte Ringer-Lösung über den Dreiwegehahn vollständig aus dem Schlauchsystem abgelassen und durch das Perfusat ersetzt. Arterieller und venöser Schenkel werden diskonnektiert und beide Schenkel je nach Durchmesser der Anschlussgefäße mit einer Arteriotomiekanüle (Durchmesser 2 oder 3 mm, Fa. Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA) oder einem modifizierten peripheren Venenverweilkatheter (Vasofix[®] Braunüle[®] 20 G und 18 G, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bestückt. Nach Kanülierung von A. und V. femoralis (siehe Kapitel 2.3.5.2.7 „Extrakorporale Perfusion des epigastrischen Lappens“ auf Seite 54) wird die Perfusion mit einem vorgegebenen Pumpvolumen von 2,20 ml/min gestartet und über einen Zeitraum von acht Stunden aufrechterhalten. Wie aus den Voruntersuchungen bekannt ist, liegen die gemessenen Blutflussmengen durch die A. femoralis zwischen 0,3 und 2,4 ml/min. Die Vorgaben entsprechen also hochnormalen Werten. Als Druckobergrenze im Schlauchsystem wurden mit 130 mmHg systolisch ebenfalls hochnormale Werte eingestellt.

2.3.6.5 Perfusatwechsel

Ein Perfusatwechsel wird erforderlich, sobald das Füllvolumen der Pumpe unter einen kritischen Wert fällt (venöses Reservoir <1 ml Füllvolumen), und sobald der engmaschig kontrollierte pH-Wert des Perfusats außerhalb des schmalen festgelegten Bereichs (pH 7,300–7,500) gerät. Der Inhalt des Schlauchsystems wird hierzu bis auf eine Restfüllmenge, die notwendig ist, um Luftblasen im arteriellen Schenkel zu vermeiden, geleert und, wie oben beschrieben, mit heparinisierem Vollblut eines Spendertiers befüllt. Alle Änderungen an der Perfusatzusammensetzung werden dokumentiert und in einer Excel-Tabelle (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) gespeichert.

2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Mittelwerte, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Median werden mit Excel (MS Excel® 14.4.1, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) berechnet. Die statistische Analyse der Daten erfolgt mit dem „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS for Mac, release 22.0.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *P*-Werte $<,05$ werden als statistisch signifikant, *p*-Werte $<,001$ als hochsignifikant betrachtet. Alle Graphen werden mit Excel oder SPSS erstellt und mit Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) graphisch, ohne Veränderung der Daten, nachbearbeitet, um ein einheitliches Layout zu erzielen.

Für die statistische Analyse der Nekroserate wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorliegen. Dabei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterscheiden. Zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p <,05$), so schließt sich der Mann-Whitney-Unabhängigkeitstest, zum Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander, an. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmungen zweier unabhängiger Verteilungen. Es handelt sich um einen Homogenitätstest, der – wie der Kruskal-Wallis-Test – auf Rangplatzsummen basiert, jedoch nur für den Vergleich zweier Gruppen ausgelegt ist. Als Referenz dient bei allen *intra vitam* Tests, soweit nicht anders beschrieben, der präoperative Basiswert.

Zum paarweisen Vergleich von Parametern innerhalb einer Versuchsgruppe wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet; ein statistischer Test für verbundene Stichproben, der gerade für kleine Stichproben geeignet ist. Der Test ist unabhängig vom Verteilungstyp und wird daher als nichtparametrisch bezeichnet.

Bei der Analyse der Daten wurde das multiple Testproblem nicht berücksichtigt. Man versteht darunter die Kumulierung der α -Fehler (Fehler 1. Art), die bei multiplen Paarvergleichen auftritt. Soll der multiple Testfehler berücksichtigt werden, müsste das Signifikanzniveau entsprechend der Bonferroni-Korrektur angepasst werden, indem das ursprüngliche Signifikanzniveau ($p = ,05$) durch die Anzahl der durchgeführten statistischen Tests geteilt wird.

2.5 VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

2.5.1 ZUSAMMENSETZUNG HÄUFIG VERWENDETER LÖSUNGEN

Fixativa und Waschlösungen

Soerensen Phosphatpuffer (pH 14)

Lösung A:

Kaliumdihydrogenphosphat (Nr. 23115, Fa. Serva, Heidelberg)	9,078 g
ad Aqua dest.	1000 ml

Lösung B:

Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (Nr. A2006, Fa. AppliChem, Darmstadt)	11,876 g
ad Aqua dest.	1000 ml

Mischungsverhältnis: 192 ml Lösung A ad 808 ml Lösung B

Glutaraldehyd 2,5 %

Glutaraldehyd 25 % (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)	10 ml
Ad Soerensen Phosphatpuffer	100 ml

Osmium Lösung 1 %

Saccharose (Nr. A1125, Fa. AppliChem, Darmstadt)	0,45 g
Aqua bidest.	1,0 ml
0,1 M HCl (Nr. 1.09060.1000, Fa. Merck, Darmstadt)	2,0 ml
Veronalacetat-Puffer	2,0 ml
Osmium Lösung 2 %	5,0 ml

Veronalacetat-Puffer (pH 10,3)

Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz 5,5 % (Nr. 6318, Fa. Merck, Darmstadt)	1,47 g
Natriumacetat (Nr. 6267, Fa. Merck, Darmstadt)	0,97 g
Aqua bidest.	50 ml

Osmium Lösung 2 %

Osmiumtetroxid (Fa. Plano W. Plannet, Wetzlar)	1 mg
Aqua bidest.	50 ml

Glycidäther-Gemisch

Mischung A:

Glycidäther 100 (Nr. 2104, Fa. Serva, Heidelberg)	38,82 g
2-Dodecenylsuccinicacid-4-Anhydrid (Nr. 10755, Fa. Serva, Heidelberg)	5,3 g

Mischung B:

Glycidäther 100 (Nr. 2104, Fa. Serva, Heidelberg)	61,8 g
Methylnacidanhydrid (Nr. 294529, Fa. Serva, Heidelberg)	56,34 g

Mischungsverhältnis: 41,2 g Mischung A ad 75,0 g Mischung B

Ad 2,4,5-Trisdimethylaminomethylphenol (Nr. 36975, Fa. Serva, Heidelberg)	1,5 ml
---	--------

Epoxidharzeinbettung

Lösung	Konzentration	Dauer	Temperatur
Osmium	1 %	2 h	4°
Waschlösung		3 x spülen	
Aceton	50 %	3 x spülen	
Aceton	70 %	10 min	4°
Aceton	70 %	10 min	4°
Aceton	90 %	10 min	4°
Aceton	90 %	10 min	4°
Aceton	100 %	20 min	4°
Aceton	100 %	20 min	18°
Aceton 100 % + Glycinäther-Gemisch	1:1	1 h	18°
Glycinäther-Gemisch	pur	30 min	18°
Glycinäther-Gemisch	pur	30 min	18°

Färbemethoden

Hämatoxylin-Eosin

Lösung	Konzentration	Dauer
Xylol (2-malig)		5 min
Alkohol	100%	5 min
Alkohol	96%	5 min
Alkohol (2-malig)	70%	2 min
Aqua dest.		5 min
Spülung unter fließendem Wasser		10 min
Hämatoxylin (Nr. 104302, Fa. Merck, Darmstadt)		25 min
Spülung mit Aqua dest.		kurz

Bläung unter fließendem Wasser		10 min
Eosin B (Nr. 115934, Fa. Merck, Darmstadt)	1%	4 min
Spülung unter fließendem Wasser		kurz
Alkohol (2-malig)	70%	kurz
Alkohol (2-malig)	80%	kurz
Alkohol (2-malig)	96%	2 min
Karboxylol		3 min
Xylol		2 min

Chemikalien und Medizinprodukte

Buprenorphin, Temgesic[®], Fa. Essex Pharma, München

Chlorhexidin Gluconat Gel, Surgilube[®], Fa. Savage Laboratories, Melville, New York, USA

Compoflex[®] 600ml Blutbeutel, Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

Dexpanthenol-haltige Augensalbe, Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Roche, Genzach-Wyhlen

Heparin-Natrium 25.000 Injektionslösung, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm

Hydroxyethylstärke (130/0,4 kD), Volulyte 6 %, Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

Indocyanin-Grün 25 mg ICG-PULSION[®], Fa. Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen

Isofluran 2%, Fa. Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA

Ketaminhydrochlorid 10%, Narketan[®], Fa. Vétoquinol GmbH, Ravensburg

Metamizol, Novaminsulfon-ratiopharm 1[®], Fa. ratiopharm GmbH, Ulm

Pentobarbital-Natrium 16g/100ml, Narcoren[®], Fa. Merial GmbH, Halbergmoos

Propran-2-ol Hautantiseptikum, Cutasept[®] F, Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim

Ringer-Lösung, Fa. DeltaSelect, Dreieich

Wasser für Injektionszwecke, Ampuwa[®], Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

Xylazinhydrochlorid 2 %, Rompun[®], Fa. Bayer Vital GmbH, Geschäftsbereich Tiergesundheit, Leverkusen

Tierexperimente

Altromin 1324, Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, Fa. Altromin International, Laage

Arteriotomiekanülen 31002 (2 mm) und 31003 (3 mm), Fa. Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA

Barometer, Fa. GHM Messtechnik GmbH Standort Greisinger, Regenstauf

Barometer, Fa. Panasonic Electric Works SUNX Co., Ltd. Kasugai City, Aichi, Japan

Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Roche, Genzach-Wyhlen

Fischer F-344 Ratten, Fa. Charles River Wiga (Europe) GmbH, Kißlegg

Heizmatte mit Temperaturregler TR-200, Fa. Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC, Canada

Insyte-W[™] 24GA 0,7 x 19 mm, Fa. Becton Dickinson AG, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Mikroinstrumente, Fa. S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Nahtmaterial Ethilon 6-0, 9-0 und 10-0, Fa. Ethicon, Norderstedt

Nutrilin 2 Fr 0,3 x 0,6 mm neonatologischer Katheter, Fa. Vygon, Écouen, Frankreich

Oxygenatormembran Oxyphan PP50/280, Fa. Membrana GmbH, Wuppertal
Raucodrape® 38 x 45 cm, Fa. Lohmann & Rauscher GmbH und Co. KG, Rengsdorf
Rollerpumpe und Motor, Ing. Büro Humbs, Valley
Sterican®, 21 G, Art.-No. 4657543, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Vasofix® Braunüle® 20 G (rosa) und 18 G (grün), Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Geräte und Software

Laborgeräte

cobas® 8000 modular analyzer, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Erbotom ICC 350, Fa. Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
Flow Probe 1,5 mm, Katalognummer MA1PRB, Fa. Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA
NONIN 8600V High-Speed-Pulsoxymeter, Fa. mediquip Medizintechnik, Kirchzarten
O2C (oxygen to see) mit LF-2 Flachsonde, Wellenlängenbereich 500–850 nm, Fa. LEA Medizintechnik GmbH, Giessen
PDE Photodynamic Eye, Fa. Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen
RAPIDLAB® 348, Fa. Siemens Sector Healthcare, Erlangen
RAPIDPoint® 500, Fa. Siemens Sector Healthcare, Erlangen
Strahlenteiler für OMPI pico f=340 und Adapter f=340 mm T2, Fa. Carl Zeiss Meditec Vertriebs-GmbH, Jena
Transit Time Perivascular Flowmeter TS420, Fa. Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA
Zeiss OPMI® pico Operationsmikroskop, Fa. Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen
Zeiss Pentero® Operationsmikroskop mit FLOW® 800 Option, Fa. Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen

Rechner und Zubehör

Apple Mac® Pro 6 x 3,5 Ghz Core Intel Xeon E5, 32 GB RAM, Fa. Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Nikon D700 Digitalkamera, Fa. Nikon Corp., Chiyoda, Tokyo, Japan
Philips 19PFL3404H/12 LCD-Fernseher 19", Fa. Koninklijke Philips N.V., Amsterdam, Niederlande
Pinnacle Video Transfer 8241, Fa. Avid Technology Inc., Burlington, MA, USA
Wacom Intuos® 3 Grafiktablett, Fa. Wacom Co., Ltd., Saitama, Japan
WD Green WD20EZR 2 TB Festplatte, Fa. Western Digital Corp., Lake Forest, CA, USA

Software

Adobe Illustrator® CS5.5 für Mac, Fa. Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

Adobe Photoshop® CS5.5 für Mac, Fa. Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

FLOW® 800 Software 2.6, Fa. Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen

IC-CALC 2.0, Fa. Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen

ImageJ® 1.48, RASBAND, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 1997–2009.

Microsoft Excel® 14.4.1 für Mac, Fa. Microsoft Corp., Redmond, WA, USA

SPSS 22.0.0.0 64-bit für Mac, Fa. SPSS Inc., Chicago, IL, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 IN VITRO EVALUATION DES PERFUSIONSSYSTEMS

3.1.1 FLUSSGESCHWINDIGKEIT

Flussmessungen werden an 12 Versuchstieren vor und nach Hebung des epigastrischen Lappens an den femoralen und epigastrischen Gefäßen durchgeführt. Das mittlere Durchflussvolumen durch eine gesunde A. femoralis der Ratte liegt bei $0,84 \pm 0,6$ ml/min. Die V. femoralis der Ratte fördert im Durchschnitt $1,29 \pm 0,63$ ml/min. Eine ausführliche Darstellung der Messwerte aller Gefäße und Zeitpunkte findet sich in Tabelle 3.1. Der statistische Vergleich der Flussgeschwindigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten erbrachte eine statistisch signifikante Reduktion des venösen Rückflusses der V. femoralis nach Lappenhebung ($p=,012$). Alle anderen Gefäße blieben durch die Lappenhebung unbeeinflusst.

Tabelle 3.1: Blutfluss durch femorale und epigastrische Gefäße der Ratte (ml/min)

Zeitpunkt		Gefäß			
		A. femoralis	V. femoralis	A. epigastrica	V. epigastrica
Vor Hebung (n = 12)	MW ± SD	0,84 ± 0,60	1,29 ± 0,63	0,28 ± 0,21	0,28 ± 0,18
	Median	0,7	1,1	0,25	0,2
	(Min – Max)	(0,3 – 2,4)	(0,5 – 2,4)	(0,1 – 0,7)	(0,1 – 0,8)
Nach Hebung (n = 12)	MW ± SD	0,55 ± 0,28	0,84 ± 0,47	0,23 ± 0,16	0,23 ± 0,13
	Median	0,55	0,75	0,15	0,20
	(Min – Max)	(0,2 – 1,1)	(0,1 – 1,8)	(0,1 – 0,5)	(0,1 – 0,5)
Vor Hebung – nach Hebung	p-Wert	,153	,012*	,438	,406

Für die statistische Auswertung dient der Wilcoxon Test. Die angegebenen p-Werte entsprechen den exakten 2-seitigen Signifikanzniveaus. (*) Statistisch signifikant ($p < ,05$).

3.1.2 LABORCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN UND HÄMOLYSE

3.1.2.1 Murines Blut

Abbildung 3.1 zeigt die Veränderungen der Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH) während achtstündiger Zirkulation durch das Perfusionssystem. Die gemessenen Basis-LDH-Werte liegen bei 188 ± 22 U/l (Tab. 3.2) und weisen über drei Stunden einen annähernd konstanten Verlauf innerhalb des Normbereichs auf (Abb. 3.1). Bereits zwei Stunden nach Zirkulationsbeginn sind die Werte im Vergleich zum Ausgangswert statistisch signifikant erhöht ($p=,039$). Zwischen der 3. und 5. Stunde weist die Kurve einen steilen Knick nach oben auf, die LDH nimmt im weiteren Verlauf statistisch signifikant auf Werte um 815 ± 61 U/l nach acht Stunden zu ($p=,008$, Tab. 3.2, Abb. 3.1). Da das verwendete Haptoglobin-Nachweisverfahren spezifisch für humanes Haptoglobin ist, entfällt die Bestimmung dieses Hämolysemarkers im murinen Blut.

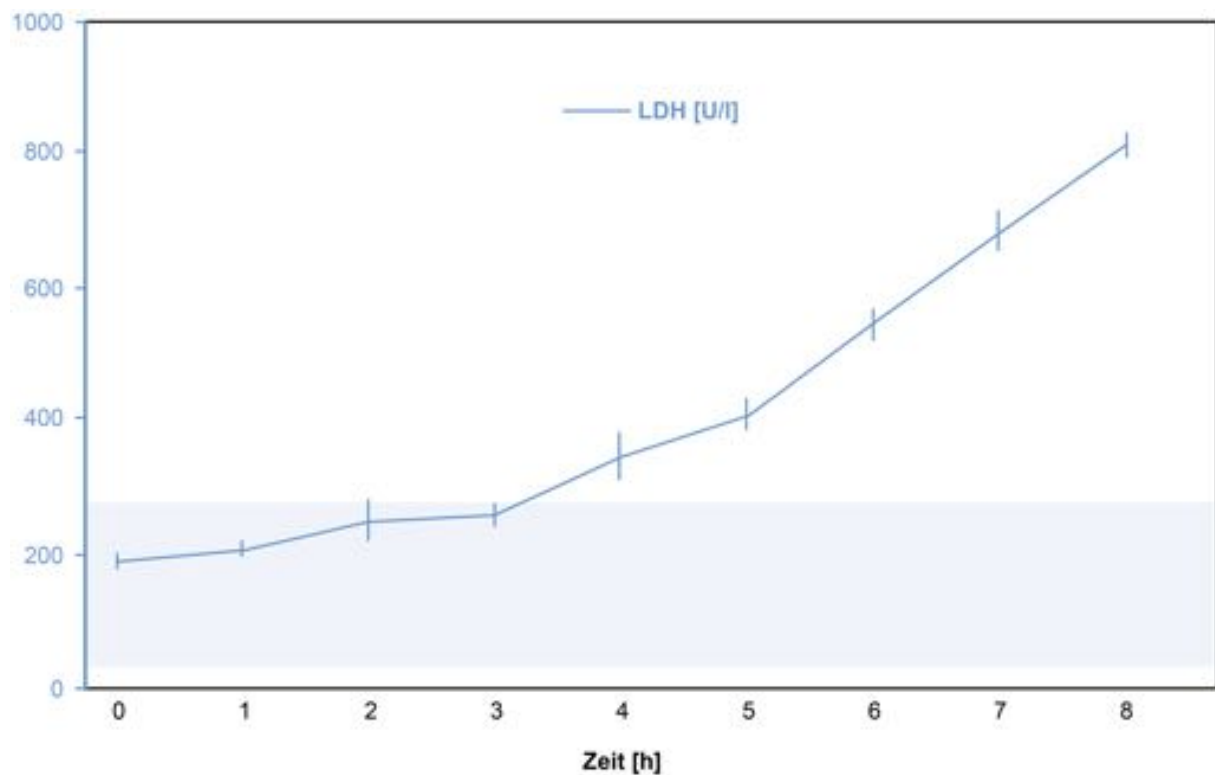


Abb. 3.1: Laktatdehydrogenaseaktivität als Hämolyseparameter in der Ratte. Der hellblaue Bereich entspricht den Referenzwerten der Laktatdehydrogenase (LDH) in gesunden Ratten nach ZUR (2005). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Tabelle 3.2: Deskriptive Statistik der BGA-Messungen von murinem Vollblut

		Zeit in Stunden								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
LDH	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MW	188	206	254	261	348	409	548	686	815
	SD	22	10	91	49	103	72	71	91	61
	Med	188	207	208	245	322	395	519	694	807
	Min	161	193	191	217	247	310	477	566	731
	Max	218	224	433	339	566	531	665	834	903
		Zeitpunkte								
		0 – 1h	1 – 2h	2 – 3h	3 – 4h	4 – 5h	5 – 6h	6 – 7h	7 – 8h	
Differenz		-18	-1	-37	-77	-73	-124	-175	-113	
p-Werte		,078	,039*						,008*	

Laktatdehydrogenaseaktivität in U/l, (n) Anzahl der Stichproben. (MW) Mittelwert, (SD) Standardabweichung, (Med) Median, (Min) Minimum, (Max) Maximum. Die angegebene Differenz entspricht der Differenz der Mediane zu den angegebenen Zeitpunkten. Die *p*-Werte entsprechen dem exakten zweiseitigen Signifikanzniveau. (*) statistisch signifikant ($p < 0,05$).

3.1.2.2 Humanes Blut

Zur Beurteilung von Hämolysevorgängen in humanem Blut werden stündliche Messungen an Blutproben von acht Probanden (sechs Männer und zwei Frauen) über einen Zeitraum von 8 Stunden sowie nach 24 Stunden durchgeführt. Für den statistischen Vergleich dient jeweils die erste Messung unmittelbar nach Blutentnahme, also noch vor Beginn der Zirkulation. Bestimmt werden die Hämolyseparameter Laktatdehydrogenase (LDH) und Haptoglobin. Zum Vergleich sind die Referenzwerte für humanes Blut in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die statistische Analyse findet sich in Tabelle 3.4.

Tabelle 3.3: Normwerte LDH und Haptoglobin

Laborparameter	Spanne \pm 2SD
LDH (U/l)	60–160
Haptoglobin (mg/dl)	30–200

Angabe der Werte als Spanne \pm zwei Standardabweichungen (SD) gemäß Merck Manual (2013).

Das Haptoglobin sinkt während der Zirkulation durch das System von initial 60,7 mg/dl (Median) kontinuierlich ab und liegt nach fünf Stunden mit 33,2 mg/dl (Median) erstmals signifikant unter dem Ausgangswert ($p = 0,016$, Abb. 3.2, Tab. 3.4). Allerdings bleiben die Werte über einen Zeitraum von sieben Stunden im Referenzbereich (Tab. 3.3). Nach 24 Stunden ist der Unterschied zum Ausgangswert nicht statistisch signifikant ($p = 0,313$, Tab. 3.4), was sich al-

lerdings durch einen Ausreißer (p -Wert nach Bereinigung des Ausreißers ,063) und eine zu diesem Messzeitpunkt zu geringe Stichprobengröße ($n=5$ nach Elimination des Ausreißers statt $n=8$ zu den anderen Messzeitpunkten) erklären lässt. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase liegt unmittelbar nach Abnahme bei 200 U/l (Median) und damit bereits über dem Normbereich (Abb. 3.2, Tab. 3.3). Im weiteren Verlauf steigt die LDH-Aktivität weiter an und liegt nach vier Stunden mit 406 U/l (Median) erstmals signifikant über dem Ausgangsniveau ($p=0,08$, Tab. 3.4).

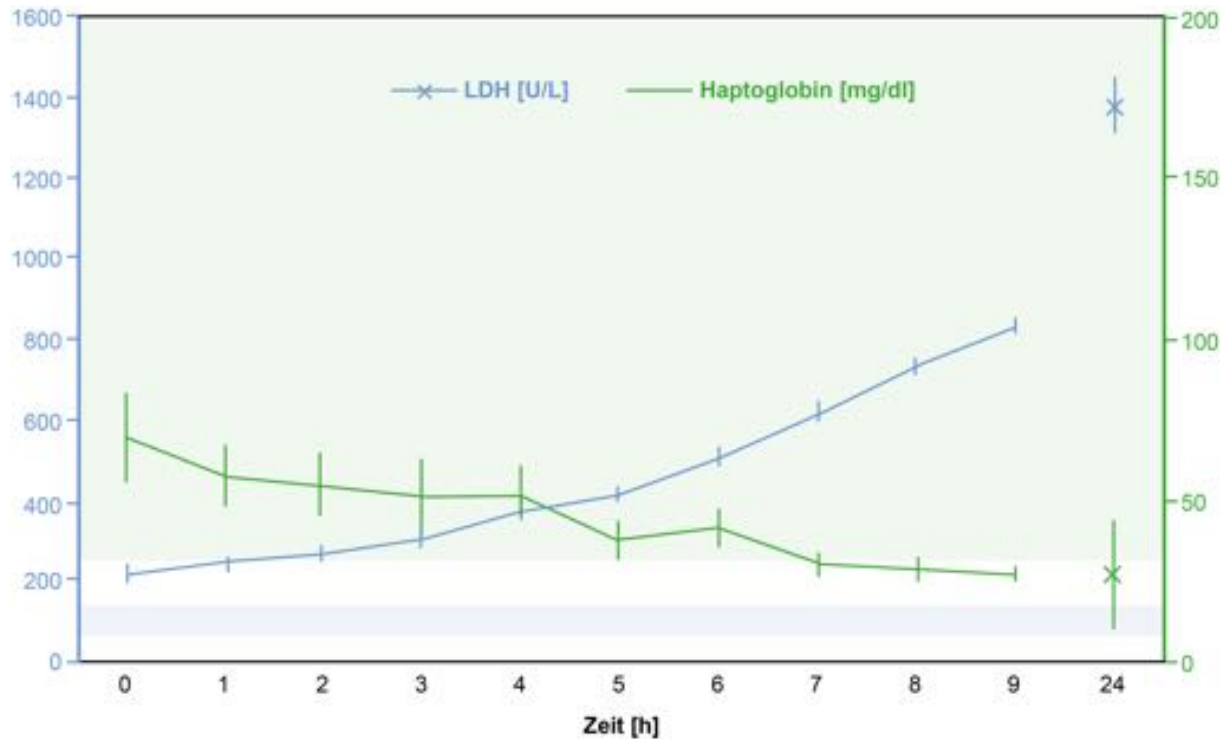


Abb. 3.2: Laktatdehydrogenase und Haptoglobin als Hämolyseparameter beim Menschen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Hellblauer Bereich: Referenzbereich für die Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH), hellgrüner Bereich: Referenzbereich für Haptoglobin gemäß Merck Manual (2013).

Tabelle 3.4: Statistik der Hämolyseparameter von humanem Vollblut

		Zeit in Stunden										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
LDH	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6
	MW	217	252	268	309	376	416	507	625	737	830	1379
	SD	54	55	54	81	84	63	59	60	36	56	164
	Med	200	255	266	300	406	408	503	625	735	847	1443
	Min	166	178	199	211	228	343	421	541	693	732	1107
	Max	324	354	370	439	485	528	605	698	799	890	1514
Haptoglobin	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6
	MW	69,9	57,8	55,1	52,3	52,0	38,1	41,7	30,6	28,8	27,4	35,5
	SD	38,4	27,8	27,9	24,0	25,8	16,6	16,6	11,0	10,6	7,0	30,8
	Med	60,7	57,6	56,8	57,3	54,1	33,2	40,3	31,3	27,5	28,0	20,5
	Min	26,3	21,8	21,1	22,2	19,3	21,4	20,5	20,3	19,1	19,1	10,3
	Max	148,9	97,9	93,1	89,2	86,4	62,3	63,9	53,7	50,4	34,2	89,9**
		Zeitpunkte										
Differenzen	0 – 1h	1 – 2h	2 – 3h	3 – 4h	4 – 5h	5 – 6h	6 – 7h	7 – 8h	8 – 24h			
LDH	-55	-11	-34	-106	-2	-95	-122	-110	-708			
Haptoglobin	3,1	0,8	-0,5	3,2	20,9	-7,1	9	3,8	7			
p-Werte	0 – 1h	0 – 2h	0 – 3h	0 – 4h	0 – 5h	0 – 6h	0 – 7h	0 – 8h	0 – 24h			
LDH	,641	,313	,055	,008*				,008*	,031*			
Haptoglobin	,641	,383	,250	,195	,016*			,008*	,313**			

Dargestellt sind die Hämolyseparameter Laktatdehydrogenase (LDH) und Haptoglobin als Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD), Median (Med), Minimum (Min) und Maximum (Max). (n) Anzahl der Stichproben. Die Differenzen entsprechen den Differenzen der Mediane zu den angegebenen Zeitpunkten. Die p-Werte entsprechen dem exakten zweiseitigen Signifikanzniveau. (*) statistisch signifikant ($p < 0,05$). (**) nach Herausrechnen eines Ausreißers $p = 0,063$ ($n = 5$). Für die statistische Analyse dient der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest.

3.2 EXTRAKORPORALE PERFUSION MIKROVASKULÄRER LAPPEN

3.2.1 KLINISCHE BEOBACHTUNGEN

Verhalten und allgemeiner Gesundheitszustand sind bei allen Versuchstieren während der gesamten Studie normal. Alle Tiere weisen während der Beobachtungszeit eine leichte Gewichtszunahme auf, zeigen regelrechtes Putzverhalten und mittlere bis hohe Aktivitätslevel. Anzeichen einer chronischen Gewebeentzündung werden in keinem der Tiere bei den *post mortem* Untersuchungen festgestellt.

Gruppe K1 – Sham-Operation

Die durchschnittliche Operationszeit liegt in Gruppe K2 (Sham-Operation) bei knapp zwei Stunden. Tiere der Versuchsgruppe K1 (Sham-Operation) weisen keine oder nur geringe Lappennekrosen nach sieben Tagen auf. Bei einem Tier entwickelt sich ein Serom, das abpunktiert wird und das keinen Einfluss auf das spätere Einheilen des Lappens hat.

Gruppe K2 – achtstündige Ischämie

Die Operationszeit in Gruppe K2 und in allen anderen Gruppen, bei denen ein achtstündiges Intervall vor Transferierung und Mikroanastomosierung des epigastrischen Lappens stattfindet (Gruppen K2, K3, ECP) liegt bei durchschnittlich 12 Stunden. Die reine OP-Zeit für das überlebende Empfängertier, auf das der Lappen transferiert wird beträgt durchschnittlich vier Stunden. Intraoperativ kommt es trotz der Lagerung des Lappens auf dem warmen, feuchten Wundbett während der achtstündigen Ischämie zu einer Exsikkose mit Verlust des natürlichen Turgors der Hautinsel. Erwartungsgemäß fehlen klinische Vitalitätszeichen (kein Rekapillarisationssphänomen). Nach erfolgter Mikroanastomosierung ist in einem Teil der Lappen eine verzögerte Rekapillarisation feststellbar. Während sich die Hautlappen der Versuchstiere K2 in den ersten zwei bis drei Tagen klinisch kaum von denen der anderen Gruppen unterscheiden, beginnt ab dem dritten Tag eine rasch progrediente Demarkierung, die bis zum siebten postoperativen Tag in allen Tieren zu einer trockenen subtotalen oder totalen Nekrose führt (Abb. 3.4E und F). In vier Tieren der Gruppe K2 werden Automutilationsercheinungen beobachtet (Abb. 3.4D). Dennoch sind alle Tiere wohlauf und zeigen keinen erhöhten Schmerzmittelbedarf.

Gruppe K3 – achtstündige in vivo Perfusion

Während der achtstündigen *in vivo* Perfusion und nach erfolgter Anastomose weisen alle Lappen typische Vitalitätszeichen auf (Rekapillarisationssphänomen, Blutungen aus dem Randbereich des Lappens). Dennoch kommt es auch in dieser Gruppe während den folgenden sieben postoperativen Tagen zu Teilnekrosen, die etwa die Hälfte des Lappens umfassen. Automutilationen werden in dieser Versuchsgruppe nicht beobachtet.

Gruppe ECP – achtstündige extrakorporale Perfusion

Nach Reperfusion der Hautlappen ändert sich die Farbe innerhalb weniger Sekunden von gräulich-fahl zu rosig. Als weiteres klinisches Zeichen für eine erfolgreiche (Re-)perfusion lässt sich ein deutliches Rekapillarisiertungsphänomen beobachten. Manche Lappen weisen in Folge einer Hyperperfusion einen sehr raschen Flush und eine kräftige rosige Färbung auf. Eine wie in den Voruntersuchungen beschriebene Ödembildung kann auch mit dem neuen Perfusionssystem und bei Verwendung der optimierten Perfusatzusammensetzung nicht vollständig verhindert werden. Diese ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Die mittlere Gewichtszunahme liegt bei 10% nach achtstündiger Perfusion, im Vergleich zu 50% nach ca. einstündiger Perfusion in den Voruntersuchungen. Auch das Phänomen des Blutverlusts aus dem Lappen ist in stark abgeschwächter Form nach Reduktion der Heparindosis (von 25 U/l in den Vorversuchen auf 10 U/l in dieser Studie) noch zu beobachten. Der minimale Füllstand der Pumpe (ca. 2 ml) wird bei den meisten Tieren nach etwa vier Stunden erreicht, was sich gut mit der im Rahmen der Vorversuche festgelegten Zeit von vier Stunden überschneidet, nach der ein Perfusatwechsel erfolgen sollte um die Perfusatzusammensetzung aufrecht erhalten zu können. In zwei Fällen ist aufgrund eines erhöhten Blutverlusts ein frühzeitiger Perfusatwechsel erforderlich. Während der achtstündigen Perfusion kommt es in unterschiedlichem Ausmaß bei allen Lappen zur Entstehung charakteristischer, nur in dieser Versuchsgruppe auftretenden petechialen Einblutungen (Abb. 3.3). Automutilationen werden auch in dieser Versuchsgruppe nicht beobachtet.

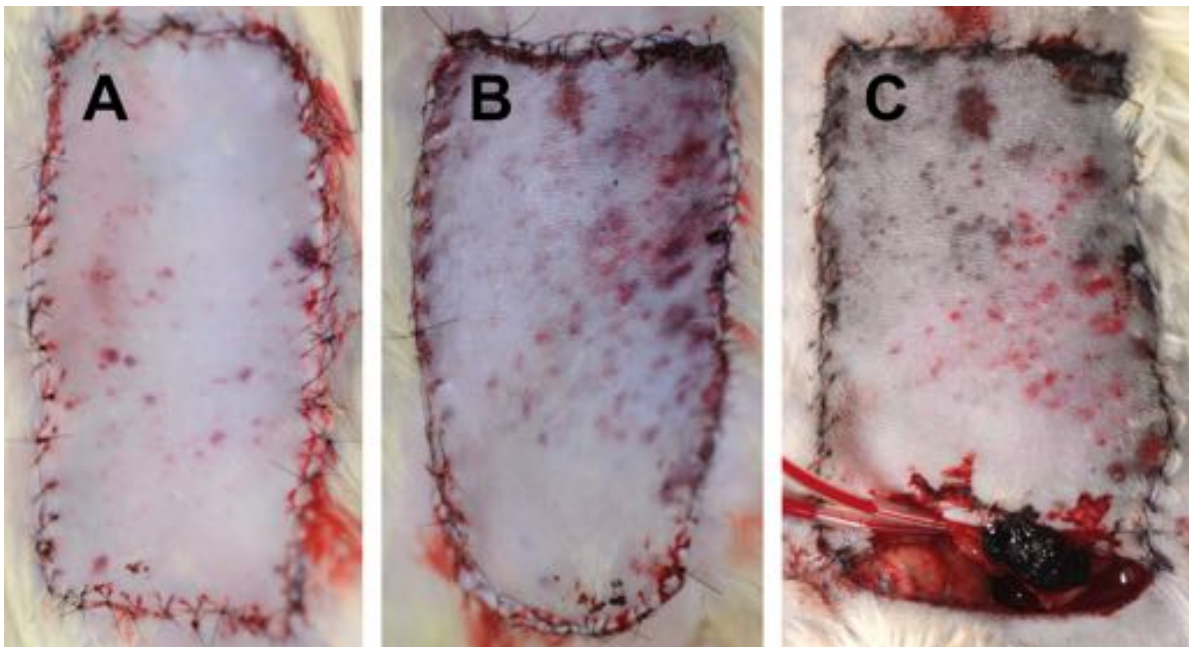


Abb. 3.3: Klinischer Eindruck epigastrischer Lappen nach extrakorporaler Perfusion. Auswahl klinischer Bilder nach achtstündiger extrakorporaler Perfusion epigastrischer Lappen der Ratte. In unterschiedlichem Ausmaß weisen alle Hautinseln charakteristische petechiale Einblutungen auf. (D) Die dunkle Färbung im kranialen Anteil ist durch ein Hämatom unter dem Lappen bedingt.

Sind diese disseminiert und von hellroter Färbung (Abb. 3.3A), so scheinen die Einblutungen keinen Einfluss auf das spätere Überleben des Transplantats zu haben (Abb. 3.3A). Konfluierende dunkel-livide Bereiche hingegen (Abb. 3.3C und D) führen in der Regel zu einer Hautnekrose in den betroffenen Arealen. Totalnekrosen und Automutilationen werden in dieser Versuchsgruppe nicht beobachtet (Abb. 3.4A–C). Das Ausmaß der Nekrosen variiert stark und liegt zwischen klinischen unauffälligen, nahezu vollständig eingeheliten Lappen bis zur Nekrose von ca. Zweidritteln der Hautinsel. Diese klinischen Beobachtungen lassen sich durch planimetrische Bestimmung der Nekroserate objektivieren.

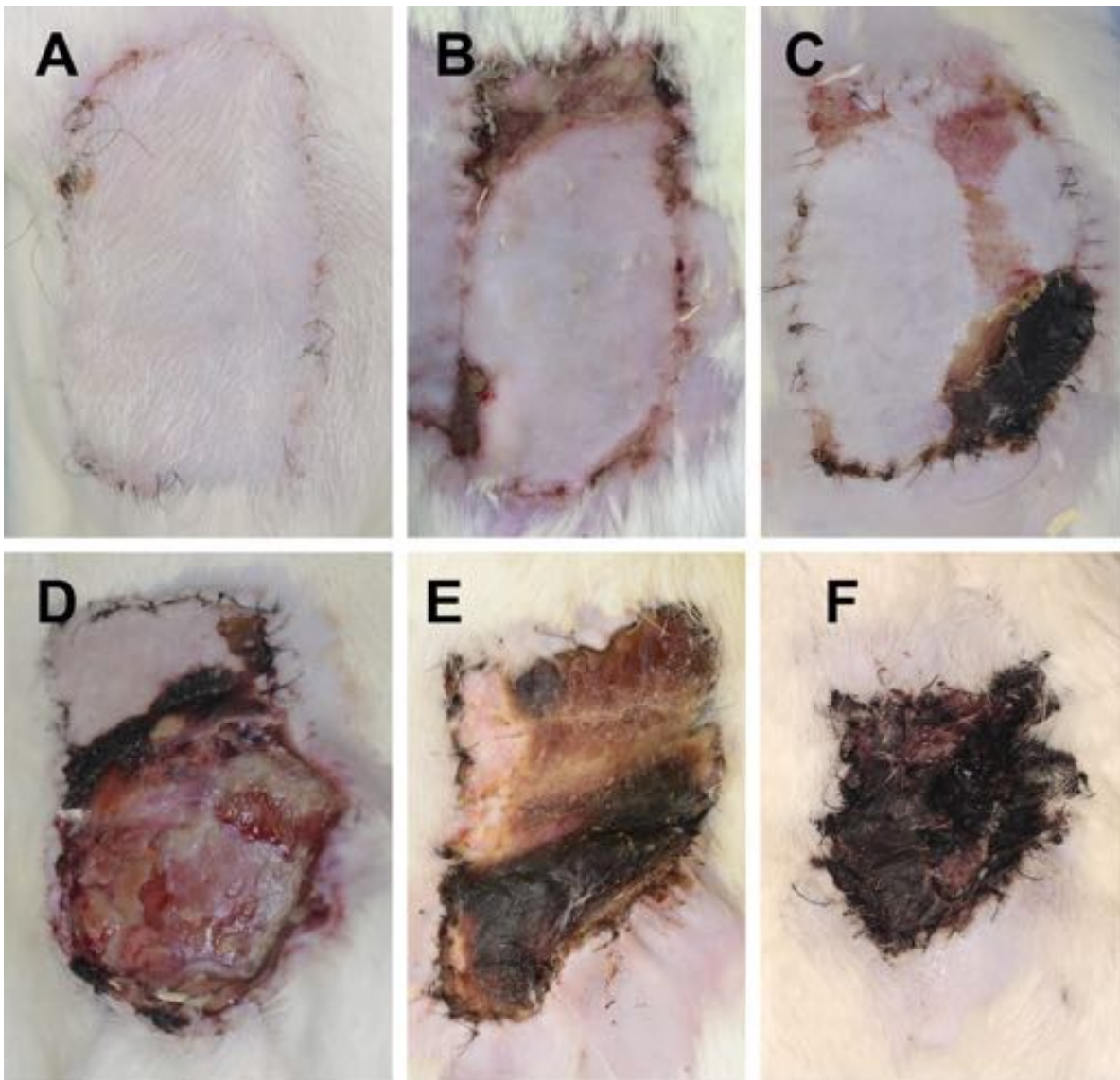


Abb. 3.4: Klinischer Eindruck epigastrischen Lappen nach sieben Tagen. Obere Zeile: Klinischer Eindruck am 7. postoperativen Tag nach extrakorporaler Perfusion und Transferierung auf ein zweites Tier (Auswahl), Untere Zeile: Automutilationen (D), subtotale (E) und Totalnekrosen (F) wie nach achtstündiger Ischämie wurden nach Überbrückung der Ischämiezeit durch extrakorporale Perfusion nicht beobachtet.

3.2.2 NEKROSERATE

Die Ergebnisse der planimeterischen Messungen der Nekroserate finden sich in Tabelle 3.5 und in Abbildung 3.5. Achtstündige ECP führte statistisch hochsignifikant ($p=,0002$) zu kleineren Nekroseflächen (27% Median) als eine achtstündige Ischämiezeit (98% Median). Hin- gegen findet sich kein statistischer Unterschied zur Sham-Gruppe (6,12% Median, $p=,05$). Auch der Unterschied zu achtstündiger *in vivo* Perfusion (49%) ist nicht statistisch signifikant ($p=,083$). Achtstündige Ischämie führt zu hochsignifikant höheren Nekroseflächen verglichen mit allen anderen Gruppen ($p=,0002$). Vergleicht man die achtstündige *in vivo* Perfusion mit der Sham-Gruppe zeigt sich ebenfalls ein statistisch hochsignifikanter Unterschied ($p=,0002$) zugunsten der Sham-Gruppe. Die p -Werte der statistischen Tests sind in Abbildung 3.5 graphisch dargestellt.

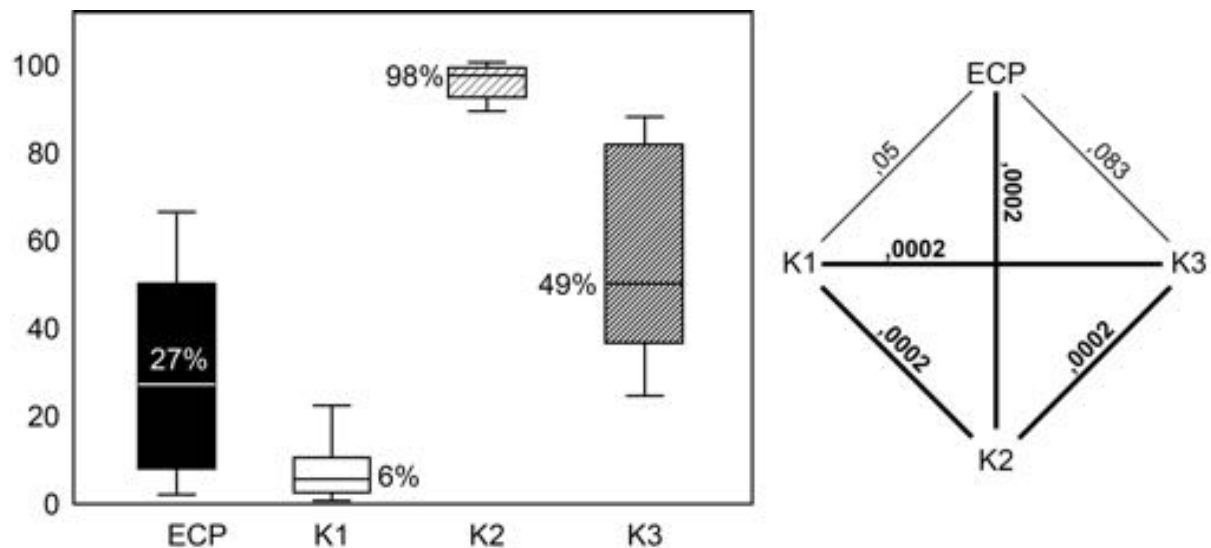


Abb. 3.5: Nekroserate. Links: Medianer Prozentsatz nekrotischer Areale am gesamten Lappen der Gruppen ECP (8-stündige extrakorporale Perfusion), K1 (Sham-Operation), K2 (8-stündige Ischämie) und K3 (8-stündige *in vivo* Perfusion). Rechts: Graphische Darstellung statistischer Unterschiede zwischen den Gruppen mit Angabe der p -Werte (signifikante Werte $p<,05$ und hochsignifikante Werte $p<,001$ sind fettgedruckt). Für die statistische Auswertung dienen der Kruskal-Wallis und der Mann-Whitney U Test. Die angegebenen p -Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test ermittelt und entsprechen dem exakten 2-seitigen Signifikanzniveau.

Tabelle 3.5: Prozentsatz nekrotischer Areale

Tier	Versuchsgruppe			
	K1	K2	K3	ECP
1	3,39	93,06	56,88	39,78
2	1,27	89,14	34,75	2,14
3	0,32	98,32	37,69	66,57
4	5,66	97,85	43,82	16,98
5	12,78	100,00	83,53	9,93
6	6,58	91,78	24,04	59,24
7	9,32	99,26	87,90	37,01
8	22,74	98,29	79,11	5,90
MW ± SD	7,76 ± 7,31	95,96 ± 4,04	54,17 ± 23,72	29,69 ± 24,69
Median (Min – Max)	6,12 (0,32 – 22,74)	98,07 (89,14 – 100)	48,82 (24,04 – 87,90)	27,00 (2,14 – 66,57)

Dargestellt ist der Prozentsatz nekrotischer Areale der Gruppen ECP (8-stündige extrakorporale Perfusion), K1 (Sham-Operation), K2 (8-stündige Ischämie) und K3 (8-stündige *in vivo* Perfusion) am 7. postoperativen Tag. Angaben als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD), der Median sowie die Spanne zwischen Minimum (Min) und Maximum (Max).

3.2.3 BLUTGASANALYSE UND LABORCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Blutgasanalysen und laborchemische Untersuchungen werden mit Beginn der extrakorporalen Perfusion in 15-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von vier Stunden aus dem Perfusat erhoben. Nach vier Stunden wird ein Perfusatwechsel durchgeführt. Bei einem Tier wird ein Perfusatwechsel aufgrund eines pH-Abfalls unter 7,300 bereits nach 3,5 Stunden durchgeführt. Im zweiten vierstündigen Perfusionsintervall werden nur sporadische Messungen durchgeführt, weshalb diese Daten nicht in die statistische Analyse einfließen. In die statistische Analyse werden die Blutgase (SO₂, pO₂, pCO₂), der Säure-Base-Haushalt (pH-Wert, HCO₃⁻, BE) sowie Kalium- und Hämoglobingehalt des „ersten“ Perfusats einbezogen. Eine Bestimmung von Metaboliten wie Glukose oder Laktat ist mit dem verwendeten Analyseggerät nicht möglich. Zum Vergleich finden sich die wichtigsten labordiagnostischen Normwerte der verwendeten Fischer-344-Ratten in Tabelle 3.6.

Tabelle 3.6: Wichtige Laborparameter normaler Ratten

Laborparameter	6–8 Wochen		18–21 Wochen	
	MW	Spanne ± 2SD	MW	Range ± 2SD
Hb (g/dl)	14,9	12,3–17,5	46	41–51
Hk (fl)	43	39–47	15,3	13,5–17,1
K ⁺ (mmol/l)	4,9	3,8–6,0	5,7	3,9–7,5
Na ⁺ (mmol/l)	141	136–146	147	144–150
Chlorid (mmol/l)	97	92–102	100	96–104
Glukose (g/dl)	204	50–358	224	87–361
LDH (U/l)*		135 (19–251)		
pH-Wert**		7,26–7,46		
pCO ₂ (mmHg)**		32,6–41,0		
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)**		14,4–23,1		

Oberer Teil: Normwerte wichtiger Laborparameter männlicher Fischer-344-Ratten als Funktion des Alters. Die Werte werden als Mittelwerte (MW) und Spanne ± zwei Standardabweichungen (SD) angegeben (Fa. Charles River, Kißlegg, CHARLES 1984). Unterer Teil: (*) Angabe der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Aktivität als MW (Spanne ± 2SD) nach ZUR (2005), (**) Angabe von pH-Wert, pCO₂ und HCO₃⁻ entsprechen Literaturangaben zu normalen Ratten (zitiert in BAKER *et al.* 1979).

Blutgase

Die Veränderungen der Blutgase innerhalb des Perfusats sind in Abbildung 3.6 abgebildet. Eine tabellarische Darstellung aller Ergebnisse findet sich aufgrund des großen Umfangs der Tabelle im Anhang auf Seite 156 (Tab. 3.8). Sauerstoffsättigung (SO_2) und Sauerstoffpartialdruck (pO_2) weisen während der gesamten Perfusion hochnormale Werte auf (Ausgangswerte SO_2 98,7%, pO_2 118,9 mmHg, Mediane). In den ersten eineinhalb Stunden steigen SO_2 ($p=,016$) und pO_2 ($p=,008$) gleichermaßen signifikant an und bleiben anschließend auf hohem Niveau (SO_2 99,3 mmHg, pO_2 131,7 mmHg nach vier Stunden) konstant. Der Partialdruck des Kohlendioxids liegt zu Beginn der Perfusion mit 17,6 mmHg (Median) unterhalb der Norm (32,6–41,0 mmHg) und nimmt im Verlauf weiter signifikant ab (7,7 mmHg, $p=,031$ nach 4 Stunden). Der arterielle Sauerstoffpartialdruck ist mit 128,4 mmHg (Median) wesentlich höher als im venösen Schenkel (34,2 mmHg, Median), was auf den hohen Sauerstoffverbrauch des perfundierten Gewebes hindeutet. Die Differenz zwischen arterieller (98,9%, Median) und venöser Sauerstoffsättigung (65,2%, Median) liegt bei 33,7%. Da das venöse Blut nicht in allen Tieren gemessen wird, muss aufgrund der zu geringen Stichprobengröße auf eine statistische Analyse dieser Daten verzichtet.

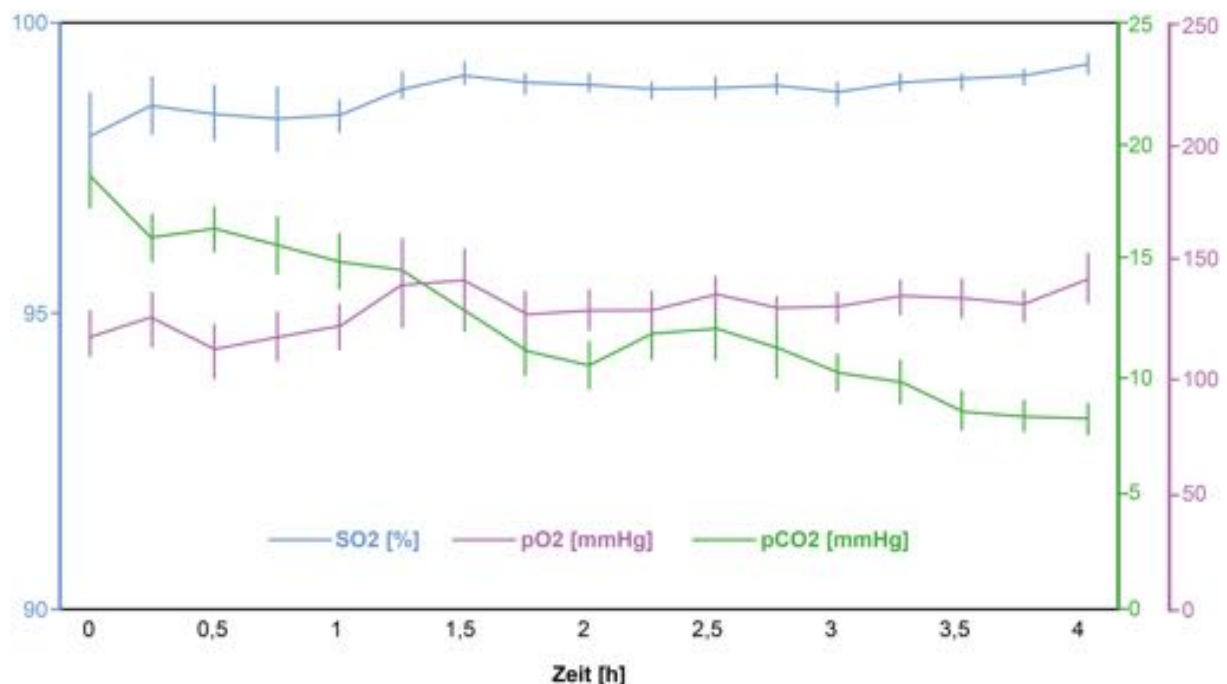


Abb. 3.6: Veränderung der Blutgase während extrakorporaler Perfusion. Durch die Verwendung eines Membranoxygenators lassen sich kontinuierlich hohe Sauerstoffsättigungen (SO_2) und Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) messen. Der Partialdruck des Kohlendioxids (pCO_2) sinkt während des vierstündigen Perfusionszeitraums kontinuierlich ab. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Säure-Base-Haushalt

Veränderungen im Säure-Base-Haushalt innerhalb des Perfusats finden sich in Abbildung 3.7. Der pH-Wert bleibt über den Zeitraum der Versuchsdurchführung ohne Zugabe eines Puffers stabil ($p=,063$) und im Normbereich (Tab. 3.6). Der Bikarbonat-Puffer ist infolge der Hämodilution erniedrigt (HCO_3^- 13,4 mmol/l, Median) und sinkt, wie der Basenüberschuss (BE $-10,3$, Median) während der vierstündigen Perfusion statistisch signifikant ab (HCO_3^- 5,1 mmol/l, BE $-18,2$, $p=,031$ nach vier Stunden, Tab. 3.7).

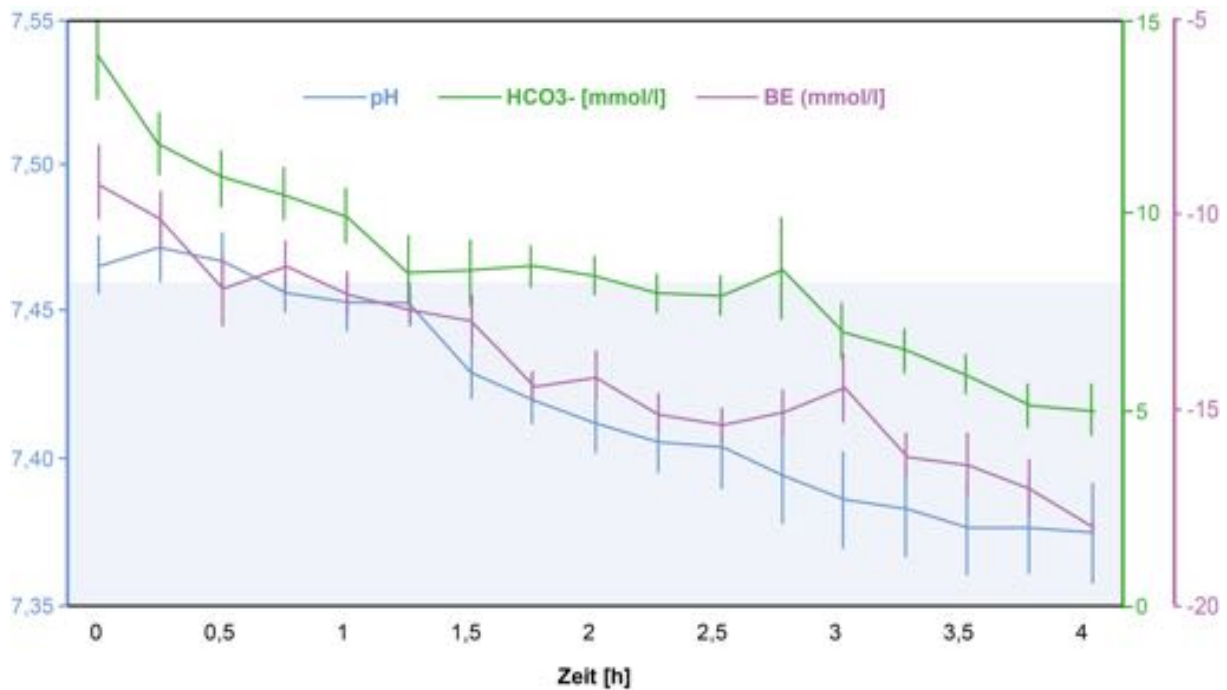


Abb. 3.7: Veränderung des Säure-Basehaushalts während extrakorporaler Perfusion. Bicarbonat-Puffer (HCO_3^-), Base Excess (BE) und pH-Wert weisen einen gleichsinnigen kontinuierlichen Abfall während des vierstündigen Perfusionszeitraums auf. Der pH-Wert kann über diesem Zeitraum ohne Substitution im Normbereich (Normwerte 7,33–7,46, hellblauer Bereich, gemäß BAKER *et al.* 1979) gehalten werden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Kalium

Das Kalium steigt während des vierstündigen Beobachtungszeitraums von 4,34 auf 5,61 mmol/l (Mediane) signifikant an ($p=,031$). Die mittleren Kaliumwerte liegen jedoch auch nach vier Stunden noch innerhalb des Referenzbereichs für Fischerratten (3,8–6 mmol/l) gemäß Normwerttabelle des Zuchthändlers (Fa. Charles River, Kißlegg, CHARLES 1984, Tab. 3.6). Aufgrund des bekannten Zusammenhangs zwischen pH-Wert und extrazellulärer Kaliumkonzentration (KLINKE UND SILBERNAGEL 1996) werden beide Parameter in einer Abbildung dargestellt (Abb. 3.8).

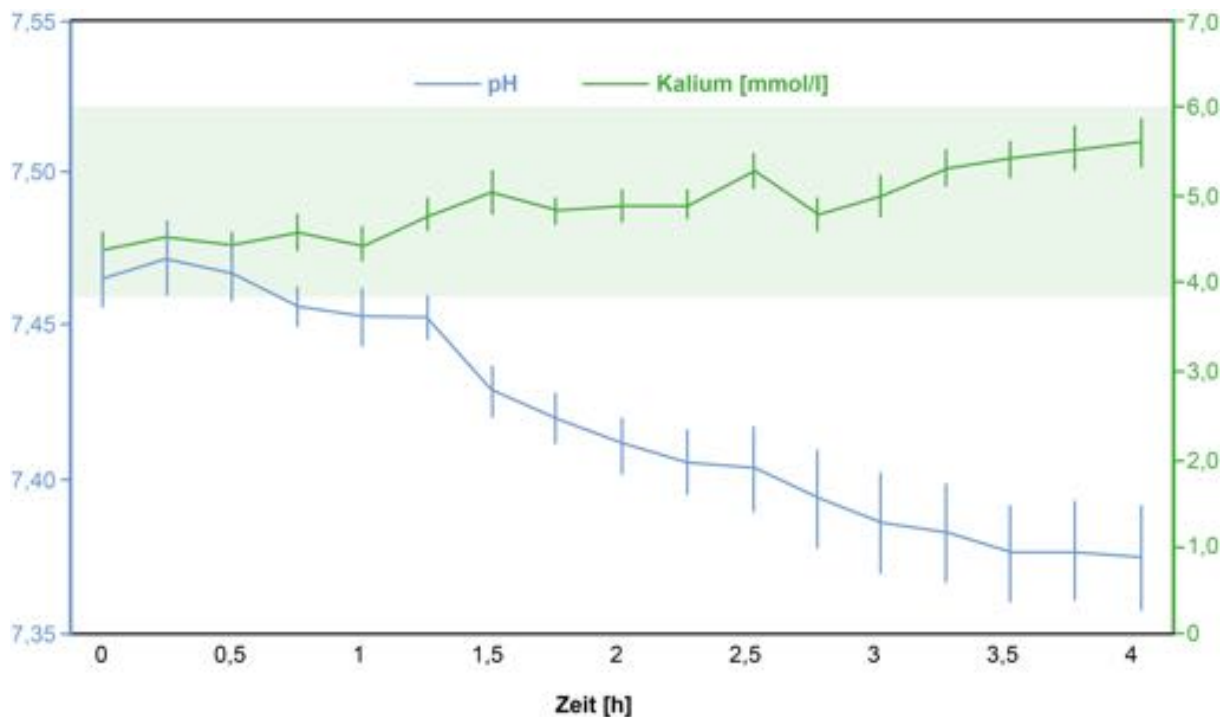


Abb. 3.8: Veränderung von pH-Wert und Kalium während extrakorporaler Perfusion. Der pH-Wert sinkt während der extrakorporalen Gewebepfusion kontinuierlich ab, kann jedoch über einen Zeitraum von vier Stunden im Normbereich (7,35–7,45) gehalten werden. Umgekehrt verhält es sich mit der im Perfusat bestimmten Kaliumkonzentration (grüne Kurve). Diese steigt kontinuierlich bis auf Werte um 5,5 mmol/l nach vier Stunden an ($p=,031$). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Referenzbereich für Kalium (hellgrün) gemäß Normwerttabelle des Zuchthändlers (Fa. Charles River, Kißlegg, CHARLES 1984).

Hämoglobingehalt

Der Hämoglobingehalt innerhalb des Perfusats ist aufgrund der Hämodilution durch Ringer-Lösung und HES im Vergleich zum Normwert der Ratte ($14,9 \pm 1,3$ g/dl, Tab. 3.6) deutlich erniedrigt ($5,1 \pm 2,3$ g/dl). Da während des vierstündigen Perfusionsintervalls die Perfusatzusammensetzung nicht verändert wird, bleibt der Hb erwartungsgemäß konstant ($p=,563$). Die Veränderungen des Hämoglobingehalts im Zeitverlauf sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

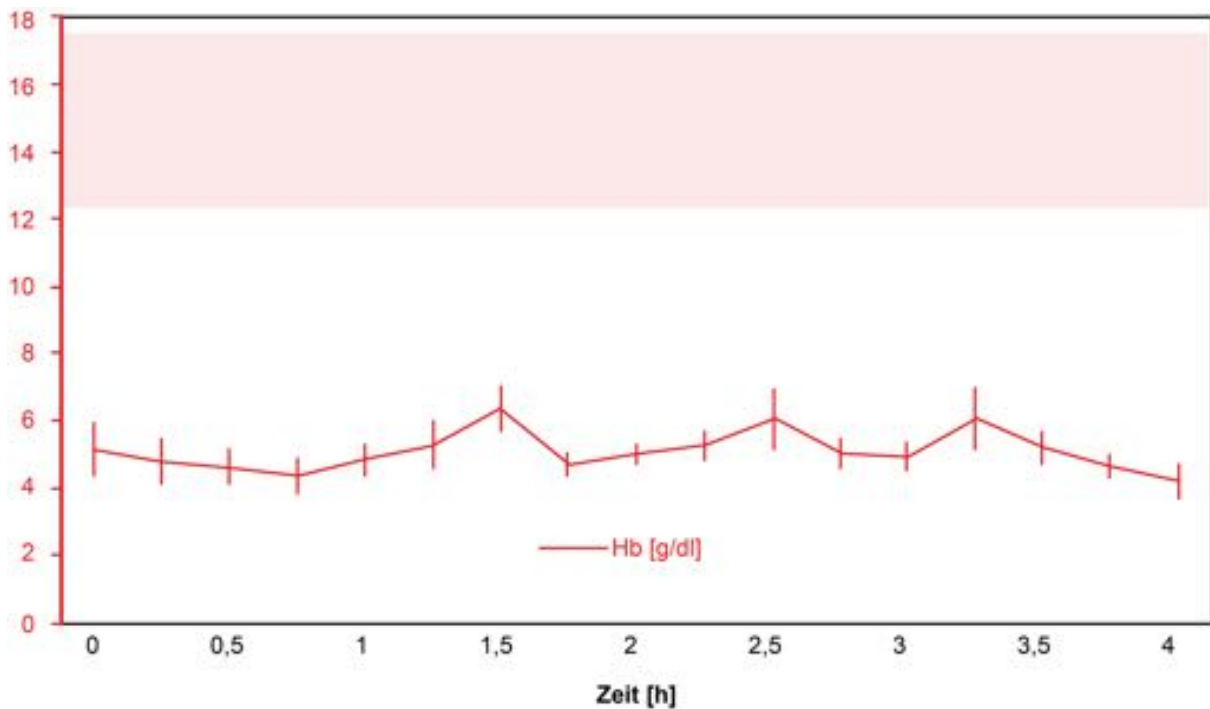


Abb. 3.9: Veränderung des Hämoglobingehalts während extrakorporaler Perfusion. Der Hämoglobingehalt des verwendeten Perfusats (Hb in g/dl) bleibt während des vierstündigen Perfusionszeitraums konstant ($p=,563$). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Referenzbereich (hellrot) gemäß Normwerttabelle des Zuchthändlers (Fa. Charles River, Kißlegg, CHARLES 1984).

Tabelle 3.7: Statistische Auswertung der Blutgasanalyse

	Parameter							
	pH	SO ₂	pO ₂	pCO ₂	HCO ₃ ⁻	BE	K ⁺	Hb
Median 0	7,464	98,7	118,9	17,6	13,4	-10,3	4,34	4,2
Median 4h	7,363	99,3	131,7	7,7	5,1	-18,2	5,61	4,5
Min	7,338	93,4	63,0	5,9	2,4	-18,4	3,33	2,0
Max	7,515	99,8	262,2	26,4	18,6	-4,5	6,45	10,3
Differenz 0 – 4h	0,101	-0,6	-12,8	9,9	8,3	7,9	-1,27	-0,3
p-Werte 0 – 4h	,063	,031*	,031*	,031*	,031*	,031*	,031*	,563

Verglichen werden die präoperativen Basiswerte der Blutgasanalyse aus dem Perfusat während extrakorporaler Perfusion des epigastrischen Lappens in der Ratte mit den Werten nach 4-stündiger extrakorporaler Perfusion. Für die statistische Auswertung wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest verwendet. Die angegebenen p -Werte entsprechen den exakten 2-seitigen Signifikanzniveaus.

3.2.4 GEWEBE-PHOTOSPEKTROMETRIE

Da klinisch evidente Nekrosen in erster Linie im kranialen und kaudalen Drittel sowie am lateralen Rand des Lappens auftreten, entscheiden wir uns dazu, die Analyse der O2C-Daten auf das Zentrum des Lappens zu beschränken. In den anderen Messregionen (kranial, kaudal) ist die Stichprobengröße aufgrund von Teilnekrosen für eine aussagekräftige statistische Analyse zu gering. Die Ergebnisse der gewebe-photospektrometrischen Messungen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Auf einen statistischen Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wird aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen dieser Methode (LOEFFELBEIN 2003) verzichtet. Die Versuchsgruppen ECP und K3 sind gewebe-photospektrometrisch am umfassendsten im Zeitverlauf erfasst. Auch ist der Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen für die Kernaussage dieser Studie am Interessantesten. Daher soll der zeitliche Verlauf der O2C-Daten dieser beiden Gruppen im Folgenden detailliert dargestellt und erläutert werden.

Sauerstoffsättigung

Der zeitliche Verlauf der Sauerstoffsättigung (SO_2) ist in Abbildung 3.9 abgebildet, die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.9. Die Kurvenverläufe der oberflächlichen und tiefen Sauerstoffsättigung während extrakorporaler und *in vivo* Perfusion weisen einen analogen Verlauf auf: unabhängig von der Perfusionsmethode kommt es mit Beginn der Perfusion zu einem statistisch signifikanten Abfall der oberflächlichen Sauerstoffsättigung (ECP $p=,039$, K3 $p=,016$) von ca. 50% auf 25% (ECP, Median) bzw. 15% (K3, Median). Nach weitgehend konstantem Verlauf während der Perfusion liegen die oberflächlichen Sauerstoffwerte nach acht Stunden weiterhin statistisch signifikant unter den Ausgangswerten ($p=,008$). Die tiefen Sauerstoffwerte hingegen bleiben, zumindest in Gruppe ECP, während des gesamten Versuchs konstant ($p=,945$). Gruppe K3 weist nach anfänglich signifikantem Abfall mit Beginn der Perfusion ($p=,031$) ebenfalls einen annähernd konstanten Verlauf der tiefen Sauerstoffsättigungswerte auf ($p=,250$) und unterscheidet sich nach achttündiger *in vivo* Perfusion nicht mehr statistisch signifikant von den Ausgangswerten ($p=,250$). Tiefe und oberflächliche Sauerstoffwerte entsprechen nach sieben Tagen in beiden Gruppen wieder dem Ausgangsniveau (SO_2 S: ECP $p=,313$, K3 $p=,625$, SO_2 D: ECP $p=1,000$, K3 $p=,188$).

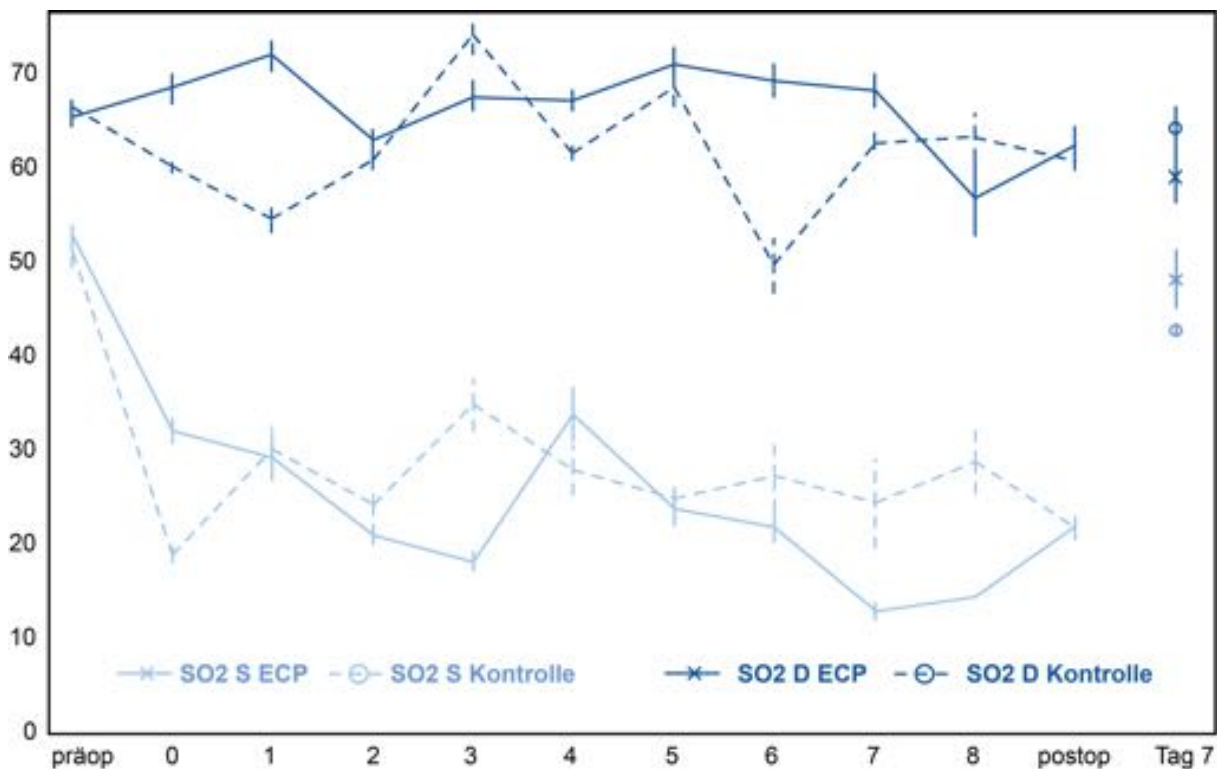


Abb. 3.10: Sauerstoffsättigung im Gewebe während extrakorporaler Perfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte der oberflächlichen (hellblau, SO_2 S) und tiefen (dunkelblau, SO_2 D) gewebe-photospektrometrisch erhobenen Sauerstoffsättigungswerte in Prozent über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs. Die Messungen erfolgen unmittelbar präoperativ (präop), über den Perfusionszeitraum von acht Stunden (0–8), postoperativ (postop) nach erfolgter Mikroanastomose und Wundverschluss sowie nach sieben Tagen. Als Fehlerindikatoren dient der Standardfehler. Als Vergleich zur extrakorporalen Perfusion (ECP) dient in dieser Darstellung Kontrollgruppe 3 (acht Stunden *in vivo* Perfusion, gestrichelt dargestellt).

Hämoglobingehalt

Der zeitliche Verlauf des Hämoglobingehalts (Hb) ist in Abbildung 3.11 dargestellt, die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.9. Während der oberflächliche Hb unabhängig von der Perfusionsmethode (*in vivo*, extrakorporal) bei Werten im 60 AU konstant bleibt (ECP $p=,093$, K3 $p=,195$), steigt der tiefe Hämoglobingehalt mit Beginn der Perfusion in beiden Gruppen statistisch signifikant von Werten um 40 AU auf ca. 85 AU an ($p=,008$). In Gruppe ECP fällt der tiefe Hb jedoch rasch wieder auf das Ausgangsniveau, in Gruppe K3 hingegen erst nach fünf Stunden. In beiden Gruppen ist der Hämoglobingehalt nach acht Stunden mit dem Ausgangswert vergleichbar (ECP $p=,375$, K3 $p=1,000$). Tiefe und oberflächliche Hb-Werte entsprechen nach sieben Tagen in beiden Gruppen wieder dem Ausgangsniveau (Hb S: ECP $p=,563$, K3 $p=,625$, Hb D: ECP $p=,375$, K3 $p=1,000$).

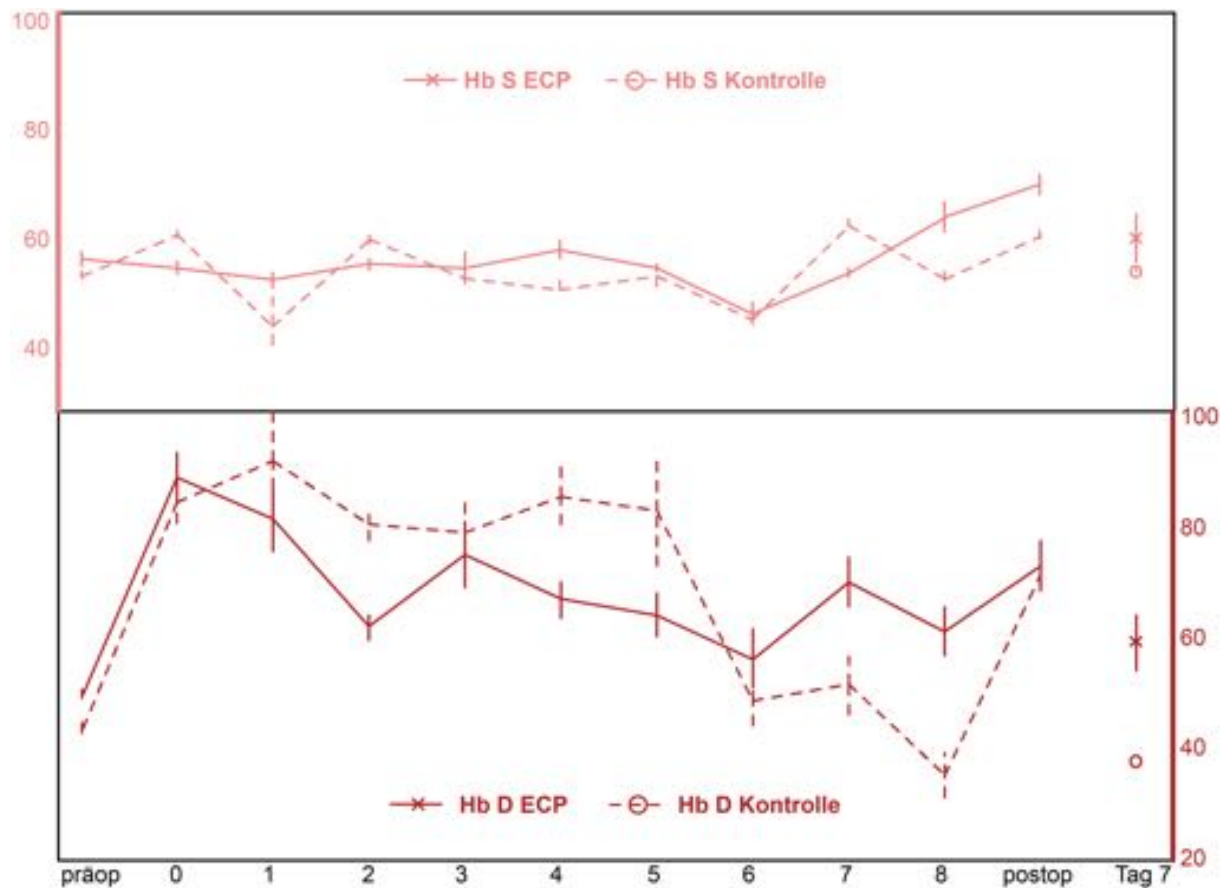


Abb. 3.11: Hämoglobingehalt im Gewebe während extrakorporaler Perfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte der intraoperativen oberflächlichen (oben, hellrot dargestellt, Hb S) und tiefen (unten, dunkelrot dargestellt, Hb D) gewebe-photospektrometrisch erhobenen Flow-Werte (arbiträre Einheit) über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs. Die Messungen erfolgen unmittelbar präoperativ (präop), über den Perfusionszeitraum von acht Stunden (0–8), postoperativ (postop) nach erfolgter Mikroanastomose und Wundverschluss sowie nach sieben Tagen. Als Fehlerindikatoren dient der Standardfehler. Als Vergleich zur extrakorporalen Perfusion (ECP) dient in dieser Darstellung Kontrollgruppe 3 (acht Stunden *in vivo* Perfusion, gestrichelt dargestellt).

Blutfließgeschwindigkeit

Abbildung 3.12 gibt den zeitlichen Verlauf der Blutfließgeschwindigkeit (Velocity) wieder, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 abgebildet. Nach initialem Abfall der oberflächlichen und tiefen Velocity, der jedoch nur in Gruppe K3 statistisch signifikant ist ($p=,016$), zeigen die zeitlichen Verläufe der Blutfließgeschwindigkeiten in beiden Versuchsgruppen einen annähernd konstanten Verlauf und sind in beiden Gruppen nach acht Stunden mit den Ausgangswerten vergleichbar (Velocity S: ECP $p=,125$, K3 $p=,500$, Velocity D: ECP $p=,125$, K3 $p=,250$). Auch wenn in Gruppe ECP unmittelbar postoperativ signifikant erniedrigte Blutfließgeschwindigkeiten gemessen werden ($p=,039$) entsprechen die gemessenen Werte nach sieben Tagen in beiden Versuchsgruppen wieder dem Ausgangsniveau oder liegen (tendenziell) sogar darüber (Velocity S: ECP $p=,563$, K3 $p=,813$, Velocity D: ECP $p=,375$, K3 $p=,125$).

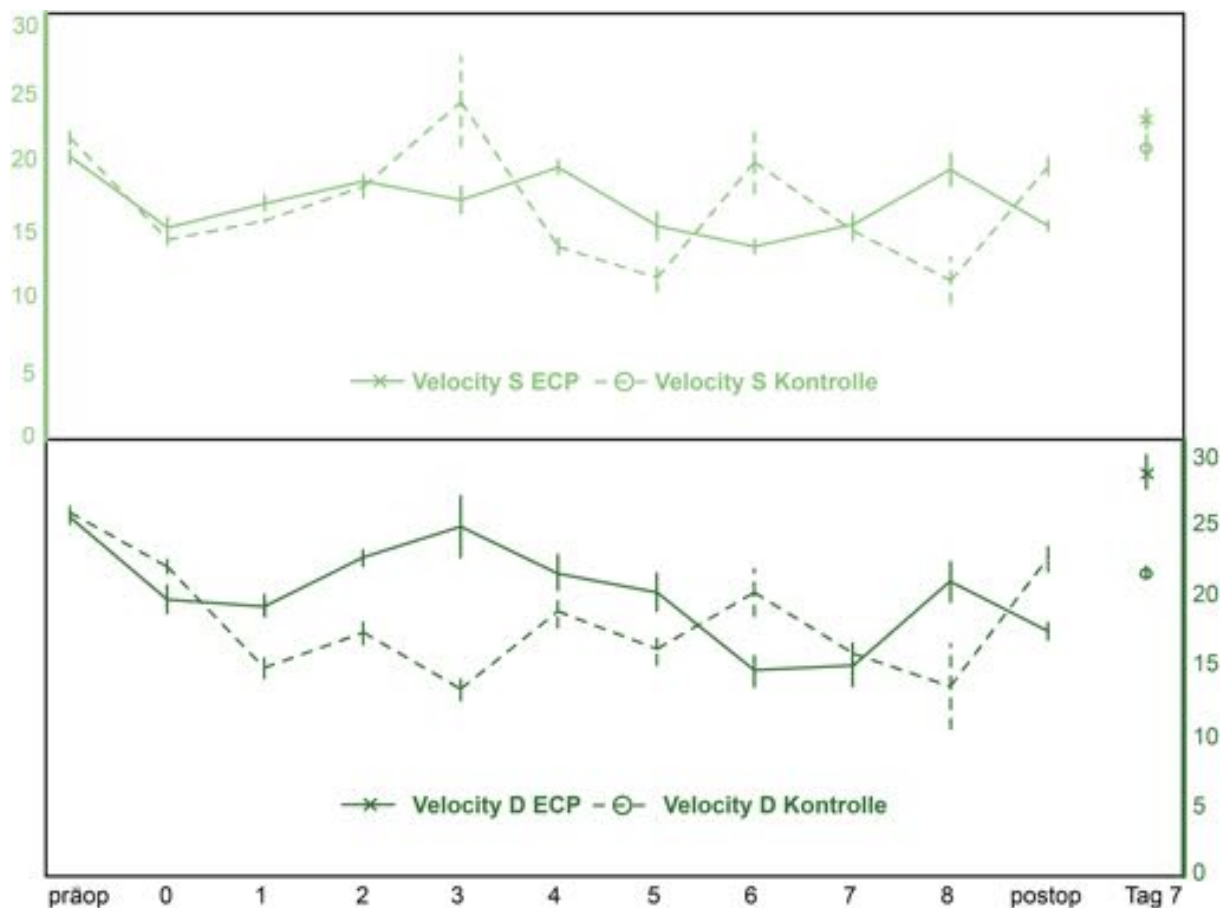


Abb. 3.12: Blutflussgeschwindigkeit im Gewebe während extrakorporaler Perfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte der intraoperativen oberflächlichen (oben, hellgrün dargestellt, Velocity S) und tiefen (unten, dunkelgrün dargestellt, Velocity D) gewebe-photospektrometrisch erhobenen „Velocity“-Werte (arbiträre Einheit) über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs. Die Messungen erfolgen unmittelbar präoperativ (präop), über den Perfusionszeitraum von acht Stunden (0–8), postoperativ (postop) nach erfolgter Mikroanastomose und Wundverschluss sowie nach sieben Tagen. Als Fehlerindikatoren dient der Standardfehler. Als Vergleich zur extrakorporalen Perfusion (ECP) dient in dieser Darstellung Kontrollgruppe 3 (acht Stunden *in vivo* Perfusion, gestrichelt dargestellt).

Blutflussvolumen

Der zeitliche Verlauf des Blutflussvolumens (Flow) ist in Abbildung 3.13 dargestellt, die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.9. Obwohl es in beiden Gruppen (ECP und K3) mit Beginn der Perfusion zunächst zu einem Abfall der oberflächlichen und tiefen Flussvolumina kommt, ist dieser nur in Gruppe K3 statistisch signifikant (Flow S: $p=,016$ nach einer Stunde, Flow D: $p=,036$ nach drei Stunden). Nach Lappentransfer und Mikroanastomose (postoperativ) sind die gemessenen Blutflussvolumina in beiden Gruppen mit den präoperativen Basiswerten vergleichbar (Flow S: ECP $p=,398$, K3 $p=,313$, Flow D: ECP $p=,195$, K3 $p=,461$). Am siebten postoperativen Tag liegen die Werte in beiden Gruppen sogar tendenziell über dem Ausgangsniveau, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant ist (Flow S: ECP $p=,438$, K3 $p=1,000$, Flow D: ECP $p=,063$, K3 $p=,625$).

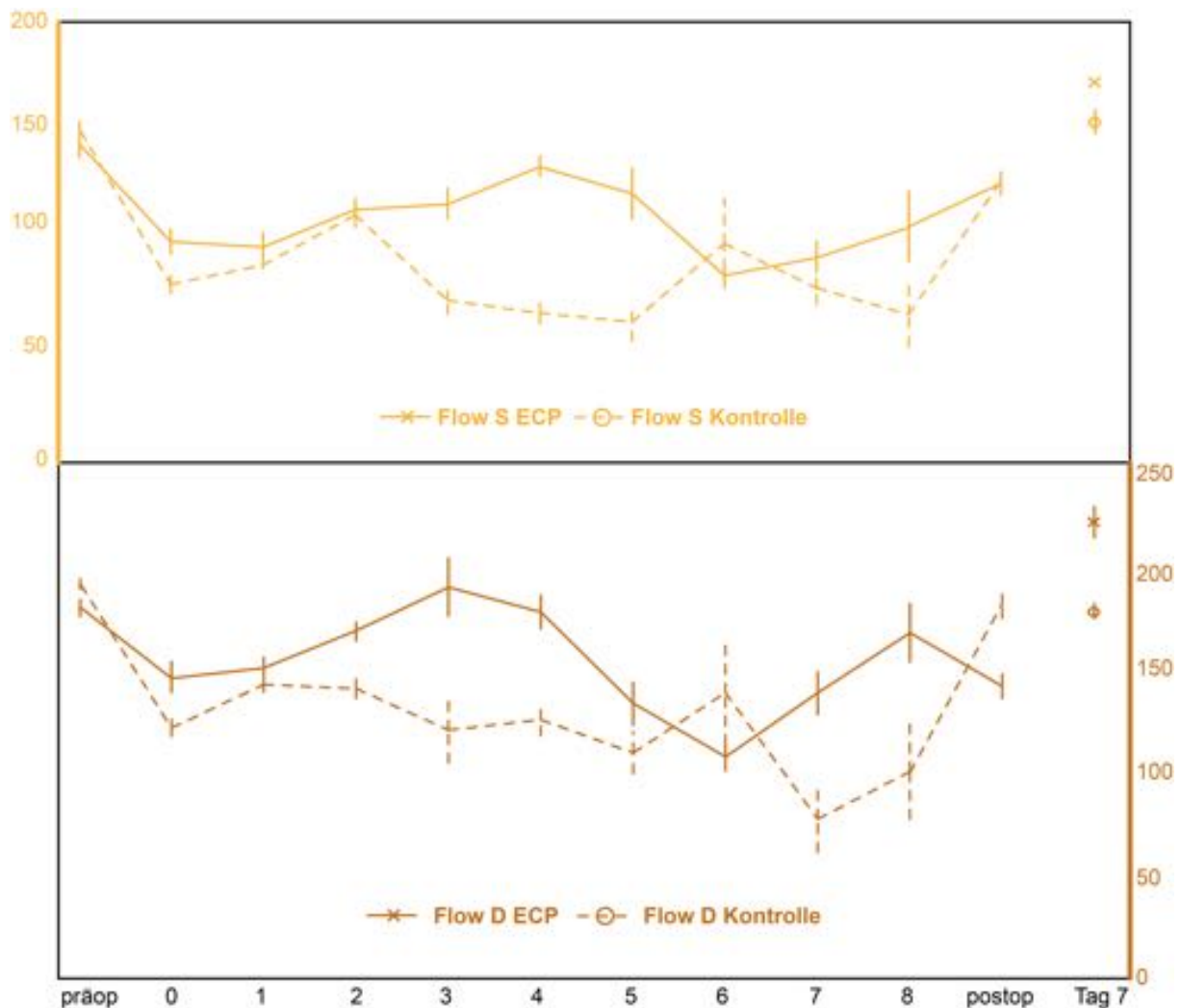


Abb. 3.13: Blutflussvolumen im Gewebe während extrakorporaler Perfusion. Dargestellt sind die Mittelwerte der intraoperativen oberflächlichen (oben, hellgelb dargestellt, Flow S) und tiefen (unten, dunkelgelb dargestellt, Flow D) gewebe-photospektrometrisch erhobenen „Flow“-Werte (arbiträre Einheit) über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs. Die Messungen erfolgen unmittelbar präoperativ (präop), über den Perfusionszeitraum von acht Stunden (0–8), postoperativ (postop) nach erfolgter Mikroanastomose und Wundverschluss sowie nach sieben Tagen. Als Fehlerindikatoren dient der Standardfehler. Als Vergleich zur extrakorporalen Perfusion (ECP) dient in dieser Darstellung Kontrollgruppe 3 (acht Stunden *in vivo* Perfusion, gestrichelt dargestellt).

Die Gewebe-Photospektrometrie ist aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen für Vergleiche zwischen zwei Studiengruppen ungeeignet (LOEFFELBEIN 2003). Da die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch, insbesondere im Zeitverlauf betrachtet, sehr deutlich sind, werden die Messergebnisse in Abb. 3.14 gesondert graphisch (Boxplots) dargestellt. Die Ergebnisse und die statistische Datenanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten sind in Tab. 3.9 dargestellt. In der Sham-Gruppe (K1) liegen nach sieben Tagen, mit Ausnahme eines signifikant erhöhten Hämoglobingehalts ($p=,008$), alle Parameter erwartungsgemäß wieder im Bereich der Ausgangswerte oder sogar darüber. Intraoperative Messungen wurden in dieser Versuchsgruppe nicht durchgeführt. Während unmittelbar postoperativ nach achtstündiger Ischämiephase (K2) zunächst nur die oberflächliche Sauerstoffsättigung statistisch signifikant erniedrigt ist ($p=,008$), weichen nach sieben Tagen nahezu alle gewebe-spektrophotometrisch gemessenen Parameter signifikant von den Ausgangswerten im Sinne einer Verschlechterung ab (Tab. 3-9). Eine detaillierte Analyse der Versuchsgruppen K3 und ECP findet sich zu Beginn dieses Kapitels.

Tabelle 3.9: Statistik der gewebe-photospektrometrischen Daten

Oberflächliche Werte

		Zeit										
		ECP			K1		K2			K3		
		präop	8h	7d	präop	7d	präop	8h	7d	präop	8h	7d
SO ₂	n	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	5
	MW	51,5	16,3	46,3	43,3	27,8	30,3	6,0	15,4	49,5	16,0	40,3
	SD	11,2	9,7	15,3	16,6	18,9	15,8	2,9	12,7	16,2	13,2	6,9
	Med	53	12	48	42	24	24	6	16	54	9	38
	Min	35	5	24	18	2	11	2	0	22	5	34
	Max	67	29	63	67	58	53	10	36	68	39	51
		0-8	41 (,125)				18 (,008*)			45 (,500)		
	8-7d	-36 (,063)				-10 (,148)			-29 (,063)			
	0-7d	5 (1,000)			19 (,461)		8 (,102)			16 (,188)		
Hb	n	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	5
	MW	57,4	68,3	60,6	54,8	61,1	68,4	71,0	56,3	55,0	60,9	55,8
	SD	8,6	13,1	12,7	6,8	5,7	8,4	23,6	28,3	9,4	10,9	5,7
	Med	56	66	58	53	61	71	79	64	55	60	55
	Min	48	51	46	45	54	54	26	0	42	49	49
	Max	75	87	83	65	70	78	94	91	70	74	64
		0-8	-10 (,715)				-8 (,445)			-5 (1,000)		
	8-7d	8 (,219)				15 (,109)			5 (,625)			
	0-7d	-2 (,345)			-8 (,008*)		7 (,250)			0 (,500)		
Flow	n	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	5
	MW	136,2	118,3	177,4	197,4	86,7	107,9	87,1	16,5	150,7	127,8	155,2
	SD	51,8	42,9	41,9	69,2	30,7	30,0	23,5	23,5	46,5	58,5	14,4
	Med	133	125	184	188	86	113	86	7	137	114	156
	Min	57	33	128	116	44	56	53	0	77	34	133
	Max	200	170	222	300	140	148	121	72	211	222	173
		0-8	8 (,125)				27 (,078)			23 (,500)		
	8-7d	-59 (,156)				79 (,016*)			-42 (1,000)			
	0-7d	-51 (,438)			102 (,945)		106 (,008*)			-19 (,1000)		
Velocity	n	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	5
	MW	20,4	15,4	23,1	26,2	15,4	27,7	25,7	14,0	21,8	19,8	21,4
	SD	4,6	3,5	3,3	6,1	3,1	13,4	15,4	16,3	4,4	6,1	2,9
	Med	21	16	24	24	16	22	19	11	20	18	21
	Min	12	10	19	20	11	17	14	0	18	13	18
	Max	25	21	27	36	19	49	53	52	30	29	25
		0-8	-4 (,125)				3 (,469)			2 (,500)		
	8-7d	-8 (,031*)				8 (,008*)			-3 (,813)			
	0-7d	-3 (,563)			8 (,945)		11 (,016*)			-1 (,813)		

Statistik der oberflächlichen, gewebe-photospektrometrisch gemessenen Werte Sauerstoffsättigung (SO₂ in %), Hämoglobingehalt (Hb, arbiträre Einheit), Blutflussvolumen (Flow, arbiträre Einheit) und Blutfließgeschwindigkeit (Velocity, arbiträre Einheit) der Gruppen (ECP) extrakorporale Perfusion, (K1) Sham-Operation, (K2) Ischämie, (K3) *in vivo* Perfusion zu den Zeitpunkten (0/ präop) präoperativer Basiswert, (8h) nach 8 Stunden und (7d) am 7. Tag. (n) Anzahl der Messwerte, (MW) Mittelwert, (SD) Standardabweichung, (Med) Median, (Min) Minimum, (Max) Maximum. (0-8, 8-7d, 0-7d) Differenz der Messwerte zu den entsprechenden Zeitpunkten, der *p*-Wert ist in Klammern angegeben. Für die statistische Analyse wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest angewendet. (*) Statistisch signifikanter Unterschied (*p*<,05).

Tiefe Werte

		Zeit										
		ECP			K1		K2			K3		
		präop	8h	7d	präop	7d	präop	8h	7d	präop	8h	7d
SO ₂	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6
	MW	52,8	81,9	59,0	47,1	60,0	30,3	6,0	15,4	63,8	60,7	57,4
	SD	11,9	58,3	4,6	18,7	11,5	15,8	2,9	12,7	3,9	18,5	14,4
	Med	53	62	59	55	61	24	6	16	64	64	51
	Min	27	56	53	17	36	11	2	0	58	31	46
	Max	64	226	66	63	72	53	10	36	69	87	76
	0-8	-28,9 (,625)					18 (,844)			0 (,500)		
	8-7d	3 (,313)					-10 (,023*)			13 (,625)		
	0-7d	-6 (,313)			-6 (,008*)		8 (,016*)			13 (,625)		
	Hb	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MW		55,7	62,9	70,5	35,8	84,3	68,4	71,0	56,3	50,4	73,6	57,7
SD		16,0	12,6	18,3	4,8	19,8	8,4	23,6	28,3	7,6	39,9	18,8
Med		53	59	72	36	79	71	79	64	48	75	52
Min		34	49	42	28	62	54	26	0	44	23	40
Max		89	86	107	43	122	78	94	91	68	145	91
0-8		-6 (,375)					-8 (,297)			-27 (1,000)		
8-7d		-13 (,313)					15 (,023*)			23 (,063)		
0-7d		-19 (,563)			-43 (,008*)		7 (,039*)			-4 (,625)		
Flow		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	MW	257,0	173,8	160,2	149,7	291,2	107,9	87,1	16,5	182,3	143,2	225,3
	SD	23,3	16,4	48,0	51,5	43,1	30,0	23,5	23,5	37,5	54,5	40,4
	Med	253	172	177	168	288	113	86	7	188	148	210
	Min	235	147	86	51	237	56	53	0	102	50	189
	Max	305	197	209	192	348	148	121	72	225	207	279
	0-8	81 (,250)					27 (,313)			40 (,500)		
	8-7d	-5 (,031*)					79 (,195)			-62 (,813)		
	0-7d	76 (,063)			-120 (,023*)		106 (,148)			-22 (,625)		
	Velocity	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MW		42,8	33,6	25,3	73,2	51,1	27,7	25,7	14,0	30,6	22,5	33,9
SD		4,7	3,2	6,8	82,1	9,1	13,4	15,4	16,3	6,2	5,6	8,7
Med		42	33	27	31	52	22	19	11	31	23	31
Min		38	30	15	26	36	17	14	0	18	13	24
Max		50	40	32	232	63	49	53	52	38	30	47
0-8		9 (,125)					3 (,266)			8 (,250)		
8-7d		6 (,016*)					8 (,008*)			-8 (1,000)		
0-7d		15 (,375)			-21 (,078)		11 (,016*)			0 (,125)		

Statistik der tiefen, gewebe-photospektrometrisch gemessenen Werte Sauerstoffsättigung (SO₂ in %), Hämoglobingehalt (Hb, arbiträre Einheit), Blutflussvolumen (Flow, arbiträre Einheit) und Blutfließgeschwindigkeit (Velocity, arbiträre Einheit) der Gruppen (ECP) extrakorporale Perfusion, (K1) Sham-Operation, (K2) Ischämie, (K3) *in vivo* Perfusion zu den Zeitpunkten (0/ präop) präoperativer Basiswert, (8h) nach 8 Stunden und (7d) am 7. Tag. (n) Anzahl der Messwerte, (MW) Mittelwert, (SD) Standardabweichung, (Med) Median, (Min) Minimum, (Max) Maximum. (0-8, 8-7d, 0-7d) Differenz der Messwerte zu den entsprechenden Zeitpunkten, der *p*-Wert ist in Klammern angegeben. Für die statistische Analyse wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest angewendet. (*) Statistisch signifikanter Unterschied (*p*<,05).

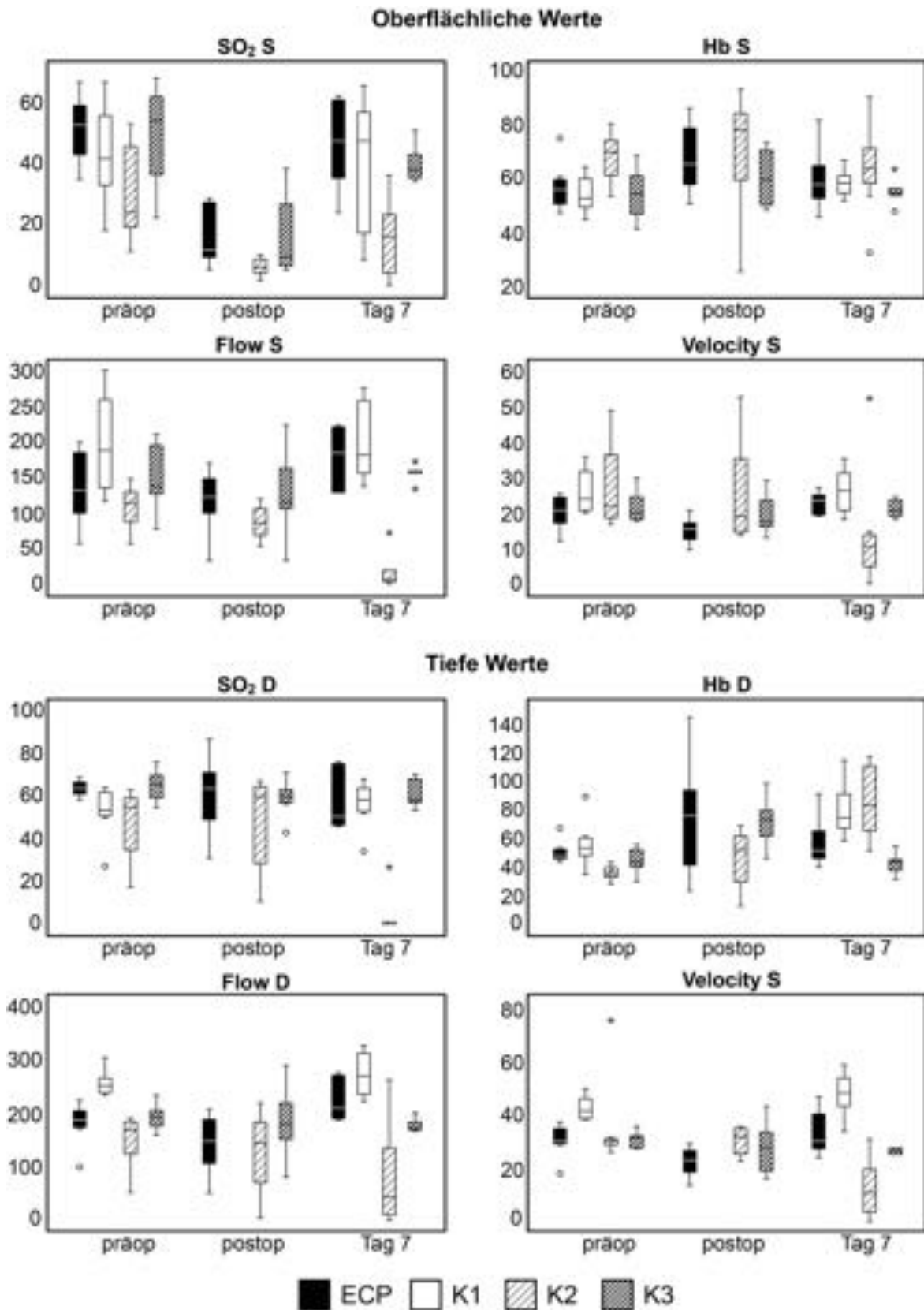


Abb. 3.14: Gewebe-photospektrometrische Ergebnisse (Boxplots). Dargestellt sind die Ergebnisse der oberflächlichen (S) und tiefen (D) gewebe-photospektrometrischen Messungen der Gruppen ECP (8-stündige extrakorporale Perfusion), K1 (Sham-Operation), K2 (8-stündige Ischämie) und K3 (8-stündige *in vivo* Perfusion) zu den Zeitpunkten präoperativ (präop), postoperativ (postop) und nach 7 Tagen (Tag 7). Sauerstoffsättigung (SO₂ in Prozent), Hämoglobingehalt (Hb, arbitrary units), Blutflussvolumen (Flow, arbitrary units), Blutfließgeschwindigkeit (Velocity, arbitrary units). Für Gruppe K1 existieren keine unmittelbar postoperativen Werte.

3.2.5 INDOCYANIN-GRÜN-VIDEOANGIOGRAPHIE

Fluoreszenzangiographische Messungen werden bei allen acht Tieren der Gruppe ECP unmittelbar nach Katheterlegung und während der extrakorporalen Perfusion durchgeführt. Am siebten postoperativen Tag wird abweichend vom Protokoll nur bei zwei Tieren eine ICG-Messung durchgeführt. Zum Vergleich werden bei drei Tieren während *in vivo* Perfusion ebenfalls ICG-Messungen durchgeführt.

Neben der geringen Stichprobenzahl am siebten postoperativen Tag wird die Vergleichbarkeit der Daten dadurch beeinträchtigt, dass zwei verschiedene technische Systeme mit unterschiedlicher Analysesoftware verwendet werden. Die Vergleichbarkeit der Daten zu verschiedenen Messzeitpunkten wird zudem durch Ungenauigkeiten in der verabreichten ICG-Konzentration beeinträchtigt: Während für einen 60 kg schweren Menschen eine ICG-Menge von 6 ml (bei einer Konzentration von 0,5 ml/kg KGW) erforderlich ist, liegt diese Menge bei einem 250 g schweren Nagern nur noch bei 0,025 ml. Versucht man die benötigte ICG-Menge auf das Gewicht des entnommen Hautlappens (ca. 15 g) herunterzurechnen, ergeben sich 0,0015 ml, also 1,5 µl. Schwankungen von Mikroliterbruchteilen können also bereits zu abweichenden Ergebnissen führen. Eine zusätzliche Fehlerquelle liegt in dem von der verfügbaren Blutmenge abhängigen variablen Füllungsvolumen des Perfusionssystems, in den der Farbstoff appliziert wird. Aus diesen Gründen wird auf die Darstellung quantitativer Analyseergebnisse und auf eine statistische Auswertung der Daten verzichtet. Die Fluoreszenzangiographie birgt dennoch wichtige Erkenntnisse für die extrakorporale Lappenperfusion auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Nach Injektion des Farbstoffs in die Vene beginnt innerhalb von Sekunden eine rasche Intensitätszunahme im gesamten rasierten Areal die je nach Messlokalisierung nach 15–30 Sekunden ihr Maximum erreicht (vgl. Abb. 3.15). Nach etwa einer Minute flaut das ICG-Signal während der venösen Phase wieder ab. Das vaskuläre Versorgungsnetz der abdominalen und inguinalen Haut ist in dieser Phase gut zu sehen (Abb. 3.15).

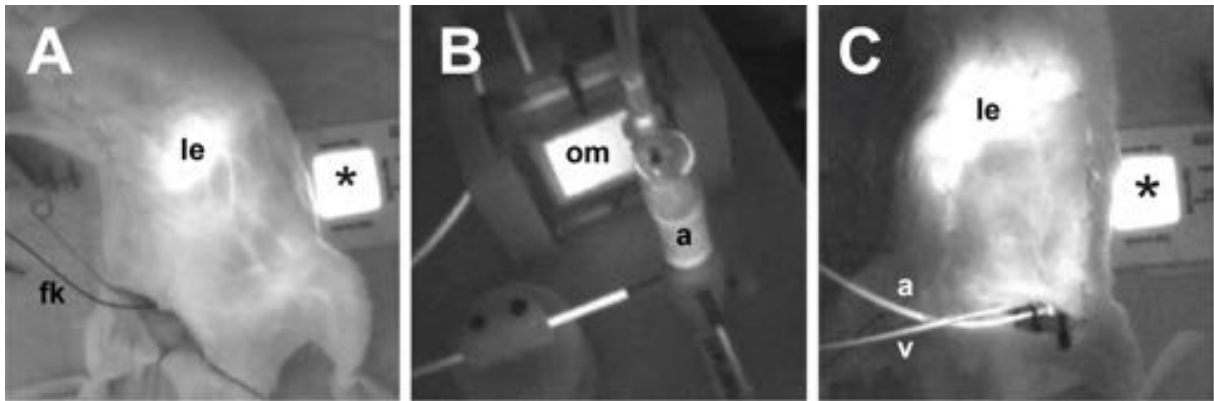


Abb. 3.15: Indocyanin-Grün Messung. (A) Präoperative Messung. Venöse Phase mit sichtbarer Gefäßzeichnung im Bereich der rasierten Regionen der abdominalen und inguinalen Haut nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs über einen Femoraliskatheter (fk). Im kranialen Anteil des rasierten Bereichs Überstrahlung durch die Leber (le). (B) Anreicherung des ICG-Farbstoffs in Schlauchsystem, Oxygenatormembran (om) und arteriellem Reservoir (a) nach Applikation des Farbstoffs in das venöse Reservoir. (C) Extrakorporal perfundierter epigastrischer Lappen mit arteriellem Zu- (a) und venösem Abfluss (v). (*) Referenzfeld mit maximaler ICG-Intensität.

Zur Messung des Fluoreszenzsignals während extrakorporaler Perfusion wird der Farbstoff direkt in das venöse Reservoir appliziert. Über die Rollerpumpe verteilt sich der Farbstoff rasch im ganzen Schlauchsystem (Abb. 3.15B). Mit Hilfe der mobilen Fluoreszenzkamera kann der Weg des Fluoreszenzsignals in den Lappen verfolgt werden. Dort kommt es analog zu den Beobachtungen während *in vivo* Perfusion zu einer Anhebung des Fluoreszenzsignals in der Hautinsel, wenngleich deutlich verzögert. Das Maximum wird nach 1–3 Minuten erreicht. Auch der venöse Rückfluss kann mit dieser Methode visualisiert und bis in das venöse Reservoir zurückverfolgt werden. Aufgrund der fehlenden Pharmakokinetik in der Leber ist selbst nach zweimaligem Perfusatwechsel noch ein deutliches ICG-Signal im Lappen nachweisbar. Nach sieben Tagen lassen sich bei zwei Tieren noch ICG-Reste im epigastrischen Lappen fluoreszenzangiographisch nachweisen. Klinisch eindrücklich ist die Vorhersagekraft der Indocyanin-Grün-Fluoreszenzangiographie. Bereiche des Lappens, die bei Fluoreszenzmessungen während extrakorporaler Perfusion kein Fluoreszenzsignal zeigen, demarkieren sich in der Regel ab dem dritten Tag und sind am siebten postoperativen Tag nekrotisch (Abb. 3.16B), während gemäß ICG-Angiographie gut perfundierte Areale in der Regel tadellos einheilen (Abb. 3.16A). Abbildung 3.17 zeigt exemplarisch den Ablauf einer Fluoreszenzanalyse während *in vivo* Perfusion. Auf vergleichende statistische Untersuchungen wurde aus o.g. Gründen verzichtet.

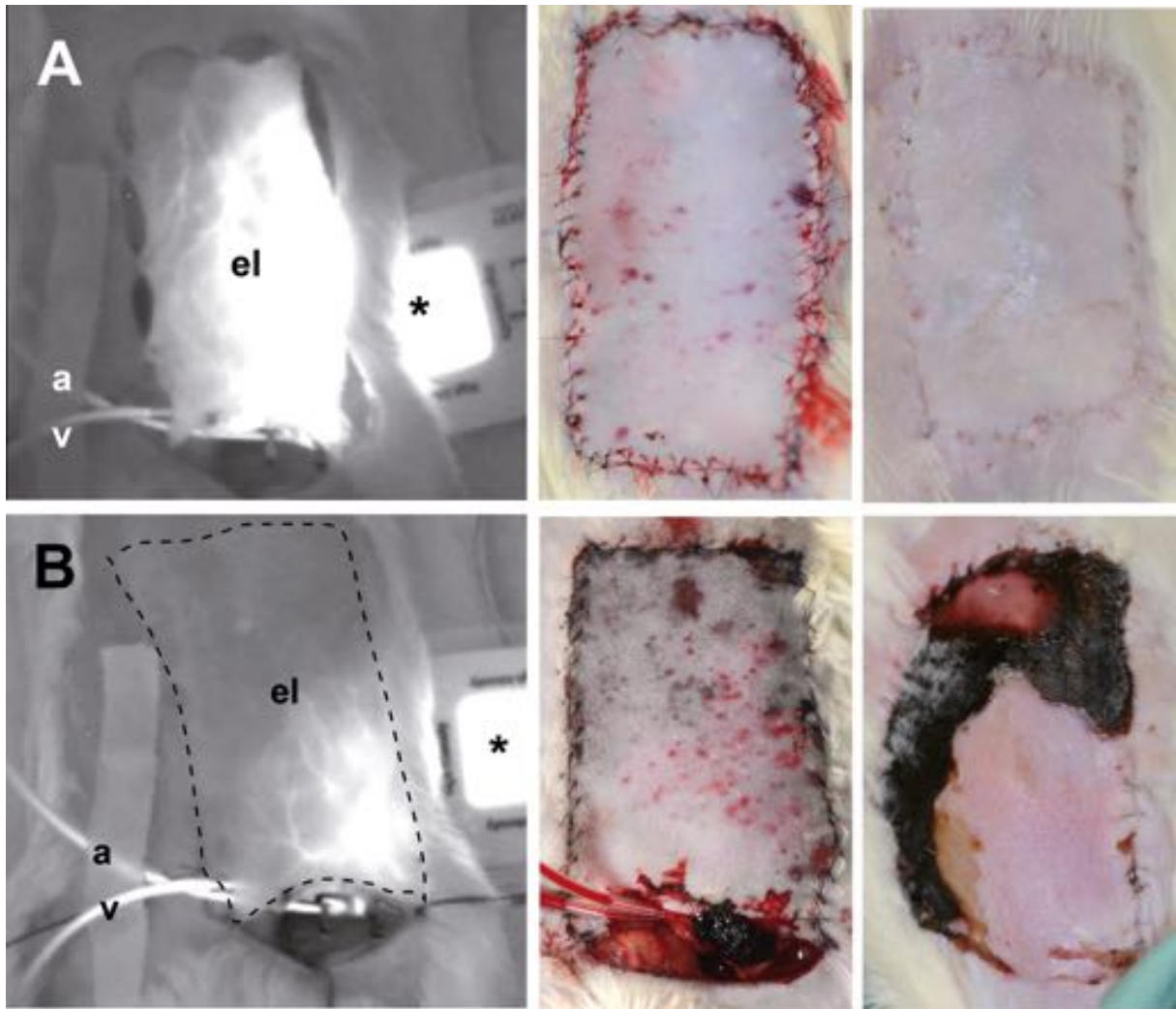


Abb. 3.16: Prädikativer Wert der Indocyanin-Grün Fluoreszenzangiographie. (A) Indocyanin-Grün (ICG)-Fluoreszenzangiographie eines extrakorporal perfundierten epigastrischen Lappens (el) mit ICG-Anreicherung im gesamten Lappen. (a) Arterieller Zufluss, (v) venöser Rückfluss, (*) Referenzfeld mit maximaler ICG-Intensität. Bild 2: Klinischer Eindruck nach achtstündiger extrakorporaler Perfusion und Transferierung des Lappens auf ein zweites Tier. Bild 3: Klinischer Eindruck am 7. postoperativen Tag. Das Bild entspricht dem in Abb. 3.4A dargestellten Lappen nach Rasur. (B) Extrakorporal perfundierter epigastrischer Lappen (ef, Lappengrenzen gestrichelt) der Ratte mit unvollständiger vaskulärer Versorgung im kranialen Bereich des Lappens. (a) Arterieller Zufluss, (v) venöser Rückfluss, (*) Referenzfeld mit maximaler ICG-Intensität. Bild 2: Klinischer Eindruck gegen Ende der achtstündigen Perfusion, die dunkleren Bereiche im kranialen Anteil weisen auf ein Hämatom unter dem Lappen hin Bild 3: klinisches Bild des Lappens am 7. postoperativen Tag mit demarkierter Nekrose im oberen Drittel des Lappens entsprechend der ICG-Messung.

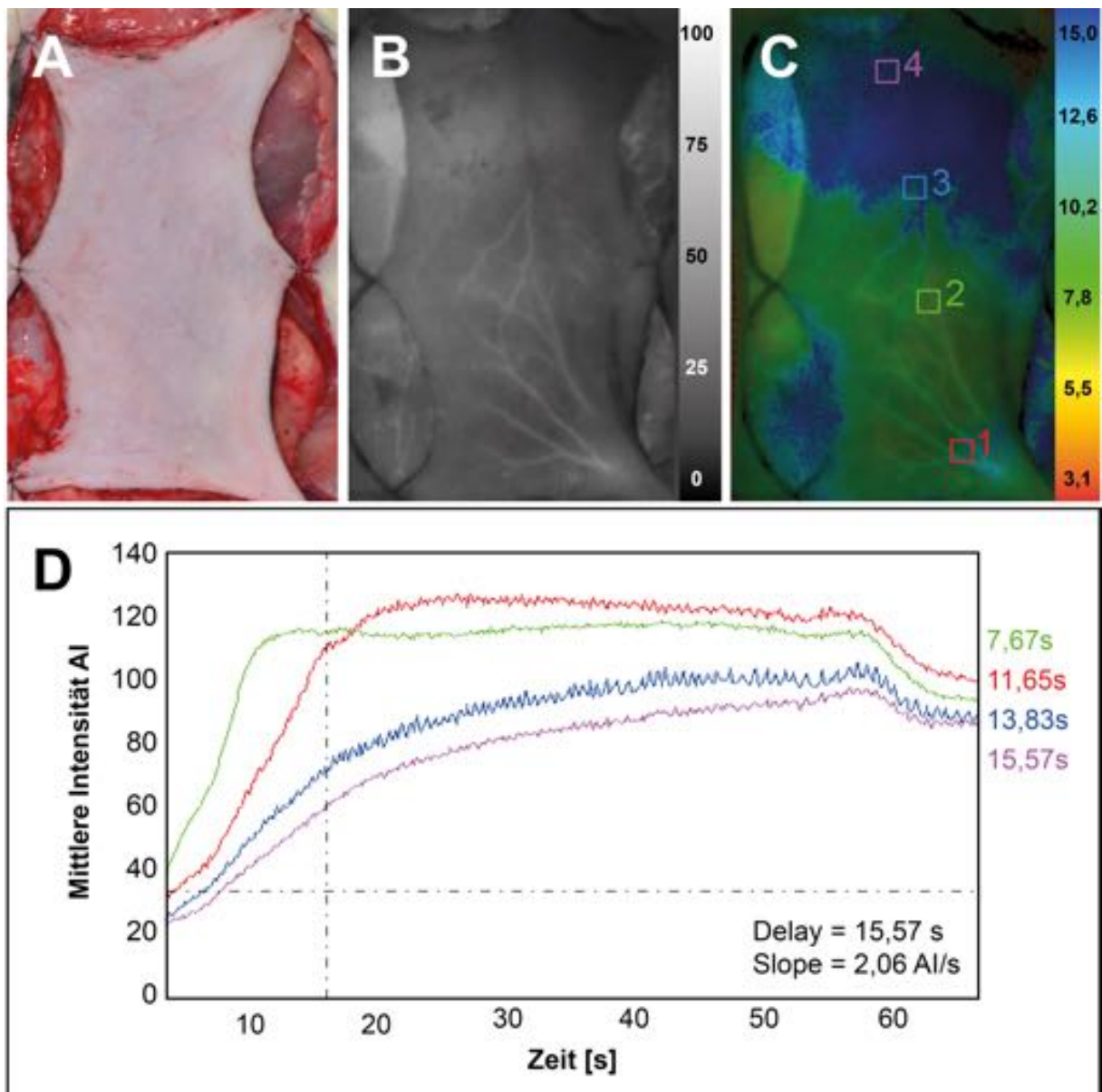


Abb. 3.17: Indocyanin-Grün Videoanalyse. (A) Vorgang der Analyse. (A) vollständig gehobener und im Wundbett refixierter extrakorporal perfundierter epigastrischer Lappen, (B) ICG-Videoangiographie mit Darstellung der maximalen Intensität in Prozent, (C) Darstellung der Anflutzeit in Sekunden mit Bestimmung von relevanten Bereichen (ROMs) auf verschiedenen Höhen des Lappens, (D) Flussanalyse im Bereich der ROMs mit Hilfe der FLOW[®] 800 Software (Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen): (1 und 2) gut perfundierter kaudaler Lappenbereich mit hoher maximaler ICG-Intensität und schneller ICG-Anflutung, (3 und 4) kritische kraniale Lappengrenze mit verzögerter ICG-Anflutung und reduzierter maximaler Intensität des ICG-Signals. (Slope) Steigung, (Delay) Zeit bis zum ersten Maximum.

3.2.6 HISTOLOGIE

Klinisch tadellos eingehheilte Lappen weisen sieben Tage nach achtstündiger Perfusion und Replantation histologisch eine reguläre Gewebearchitektur ohne degenerative Veränderungen von Haut und Hautanhangsgebilden, Fettgewebe, Gefäßen, Muskeln oder Lymphknoten auf (Abb. 3.18A). Der Gefäßstiel ist klinisch (Sondierung, Inspektion) und histologisch bei allen untersuchten Lappen durchgängig und weist ebenfalls keine degenerativen Veränderungen auf. Lichtmikroskopisch finden sich keine Hinweise auf bakterielle Infiltrationen in den untersuchten Präparaten. Abbildung 3.18B zeigt einen Ausschnitt aus einem (teil-)nekrotischen Areal mit histologisch erkennbarer Unterbrechung des Epithels.

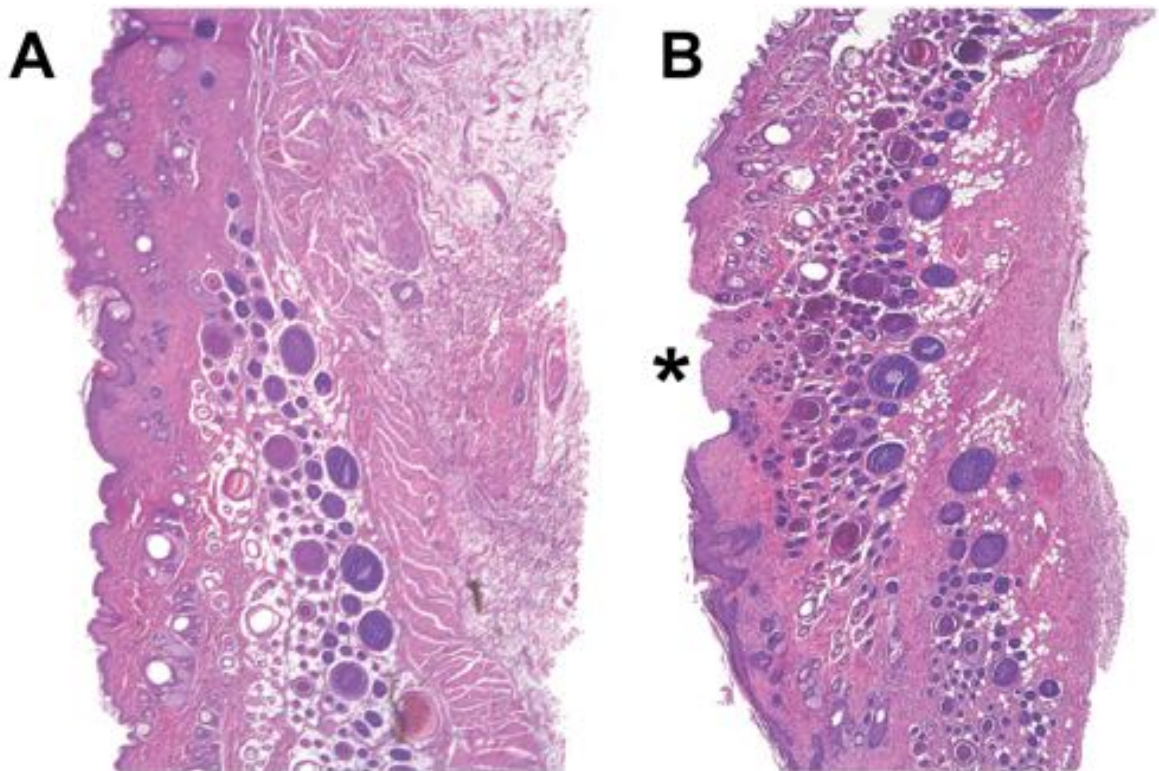


Abb. 3.18: Auswahl histologischer Bilder. HE-Färbung, 30-fache Vergrößerung. Dargestellt sind zwei extrakorporal perfundierte und anschließend replantierte epigastrische Lappen der Ratte. (A) Tadellos eingehheilter epigastrischer Lappen mit normalem Aufbau der Gewebeschichten und regelrechtem Epithel. (B) Ausschnitt aus teilnekrotischem Areal mit Disruption des Epithels (*).

4 DISKUSSION

4.1 PROBLEMSTELLUNG

Trotz immenser Fortschritte in der rekonstruktiven Chirurgie seit Einführung mikrochirurgischer Techniken stoßen wir nach wie vor bei der Rekonstruktion mehrfach voroperierter und vorbestrahlter Patienten an die Grenzen der Versorgungsmöglichkeit, da die für eine mikrovaskuläre Gewebeerpflanzung notwendigen Anschlussgefäße fehlen. Alternative Techniken, wie gestielte Lappen, Gefäßinterponate, AV-Loops, venöse Durchflusslappen etc. sind technisch schwierig, fehleranfällig oder mit teils schweren funktionellen und ästhetischen Einbußen verbunden. Spätestens bei komplexen Rekonstruktionen, wie der kaufunktionellen Rehabilitation mit Ersatz des Unterkiefers, stoßen alle bisherigen Methoden im gefäßverarmten Hals an ihre Grenzen. Die in der vorliegenden Arbeit thematisierte ECP von Gewebetransplantaten eröffnet neue Möglichkeiten des Vitalerhalts freier Gewebe und soll in der Zukunft die Einheilung mehrschichtiger Gewebelappen ohne den bisher notwendigen Gefäßanschluss ermöglichen.

Damit eine Verpflanzung von mikrovaskulären Transplantaten ohne versorgende Gefäße überhaupt funktionieren kann, müssen zwei Grundbedingungen erfüllt werden:

1. transplantiertes Gewebe muss in einem Defekt revaskularisiert und autonom von seinem versorgenden Gefäßstiel werden
2. transplantiertes Gewebe muss über den Zeitraum, der für eine sichere Revaskularisierung notwendig ist, vital erhalten werden können

Die Bestätigung der ersten Grundbedingung bringen tierexperimentelle und klinische Untersuchungen, die zeigen, dass mikrovaskulär verpflanzte Transplantate nur für eine bestimmte Zeit lang von dem versorgenden Gefäßstiel abhängig sind (CHUBB *et al.* 2010) bis Gefäße in ausreichender Zahl aus dem Wundgrund und angrenzenden Geweben eingewachsen sind, um eine Versorgung des Lappens unabhängig vom Gefäßstiel sicherzustellen (BLACK *et al.* 1978; BALLANTYNE *et al.* 1980; WOLFF *et al.* 2009; MÜCKE *et al.* 2011). Bei der Rekonstruktion mit gestielten Lappen (z.B. Pectorallappen) wird in der Regel ein Intervall von drei Wochen abgewartet bis der Gefäßstiel ohne Gefährdung des Rekonstruktionsergebnisses abgesetzt und überschüssiges Gewebe rückverlagert werden kann. Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien legen nahe, dass der Zeitraum bis zur Autonomisierung möglicherweise wesentlich kürzer ist. Im Rattenmodell waren mikrochirurgisch replantierte epigastrische Lappen nach 5–7 Tagen (BALLANTYNE *et al.* 1980; MÜCKE *et al.* 2011), kleindimensionierte venöse Lappen im Kaninchenmodell bereits nach 3 Tagen (MAEDA *et al.* 1993), unabhängig vom Gefäßstiel. Diese Zahlen werden im Großtiermodell bestätigt. So blieben replantierte, großdimensionierte, mikrovaskuläre, epigastrische Lappen im Schwein nach Stieldruchtren-

nung zwischen dem 6. und 8 Tag vital (BLACK *et al.* 1978). Auch beim Patienten konnten große osteomyokutane Lappen innerhalb von 18 Tagen zur Einheilung gebracht und der versorgende Gefäßstiel abgesetzt werden (WOLFF *et al.* 2009).

Je nach Größe und Zusammensetzung des Lappens müsste dieser also mindestens über einen Zeitraum von 3–18 Tagen *ex vivo* vital erhalten werden können, um einen ausreichenden zeitlichen Rahmen für eine zuverlässige Revaskularisierung zu gewährleisten. Erschwerend kommt allerdings hinzu, dass für eine frühe Autonomisierung ein gesundes Wundbett bedeutsam scheint (BLACK *et al.* 1978; MAEDA *et al.* 1993). Der klinische Alltag zeigt allerdings häufig ein anderes Szenario (MÜCKE *et al.* 2011), zumal gerade in dem Patientengut, das von einer solchen Therapie am meisten profitieren würde, das Wundbett infolge von Voroperationen, chronischen Wundinfektionen oder Bestrahlungen meist kompromittiert ist (MOSCOSO *et al.* 1994; COHN *et al.* 2008; KRUSE *et al.* 2010; MÜCKE *et al.* 2010b). Der Zeitraum, der für eine Autonomisierung im kompromittierten Wundbett notwendig ist, liegt also möglicherweise höher. Dass eine Einheilung auch in kompromittierten Wundbetten ohne Anschlussgefäße möglich ist, demonstrieren WOLFF *et al.* (2009) mit der Verpflanzung eines kombinierten anterolateralen Oberschenkel- und osteomyokutanen Fibulalappens in einen vorbestrahlten voroperierten Hals. Der Lappen wurde als „Carrier-Lappen“ vorübergehend über Anastomosen mit den radialen Gefäßen am Handgelenk perfundiert und heilte nach Stieldruchtrennung am 18. postoperativen autonom vom versorgenden Gefäßstiel ein.

Die ECP von Organen wurde bereits in den 1930er Jahren in einer bahnbrechenden Arbeit von Alexis CARREL demonstriert (z.i. WORNER *et al.* 2014) und wird heute klinisch für den Vitalerhalt von Organen eingesetzt (HOSGOOD UND NICHOLSON 2011; NICHOLSON UND HOSGOOD 2013; HOSGOOD UND NICHOLSON 2014). Im Gegensatz zu Organen setzen sich freie Gewebetransplantate und Extremitäten aus verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Toleranz gegenüber Ischämieschäden zusammen. Während längere Ischämieintervalle von Knochen, Sehnen, Haut und Fett relativ gut toleriert werden, weisen Muskulatur, Blutgefäße und neuronale Gewebe eine sehr niedrige Ischämietoleranz auf (BLAISDELL 2002). Die warme Ischämiezeit, d.h. die Zeit, die ein bestimmtes Gewebe eine fehlende Oxygenation ohne besondere Maßnahmen wie Kühlung tolerieren kann, sollte bei zusammengesetzten mikrovaskulären Lappen unter sechs Stunden liegen (MAYER *et al.* 1993). Ein längerer Gewebeerhalt wird heute prinzipiell auf zwei Weisen erzielt: Immersion und Perfusion (MAEDA *et al.* 1993). Unter Immersion versteht man das Einlegen in bestimmte Nährlösungen, Perfusion bedeutet das Infundieren oder Durchspülen einer Nährlösung über das bestehende Gefäßnetzwerk. Vollhaut konnte bereits Anfang des letzten Jahrhunderts bis zu einer Woche und länger durch Kühlung nahe dem Nullpunkt und spezielle Lagerung aufbewahrt werden (WENTSCHER 1903). Durch moderne Verfahren ist heute eine maximale Lagerung von Haut-

transplantaten über acht Wochen möglich (z.i. BALLANTYNE *et al.* 1980), wobei die klinische Überlebensfähigkeit solcher Transplantate nach drei Wochen Lagerung rapide sinkt (GEORGIADIS *et al.* 1956). Der Zeitraum, über den zusammengesetzte Gewebe durch Kühlung und Lagerung in speziellen Nährlösungen vital erhalten werden können, liegt mit maximal 1–3 Tagen deutlich unter dem von reinen Hauttransplantaten (BALLANTYNE *et al.* 1980; MAYER 1992).

Die extrakorporale Gewebepерfusion verwendet einen anderen Ansatz. Für den Erfolg einer Trans- bzw. Replantation bleibt die Zeit bis zur Reoxygenierung der limitierende Faktor. Anstatt durch Kühlung und spezielle Lagerungsbedingungen den Stoffwechsel des Gewebes soweit zu senken, dass eine Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum möglich wird, stellt die ECP die Versorgung des Transplants mit Sauerstoff und Metaboliten über das bestehende Gefäßsystem sofort wieder her und fördert damit die Aufrechterhaltung normaler physiologischer Prozesse innerhalb des Gewebes. Man könnte also von einer „warmen Vitalitätserhaltung“ sprechen. Dieser Denkansatz schließt das Prinzip der Kühlung jedoch nicht aus. Vielmehr kann durch Abkühlung des Perfusats trotzdem eine Hypothermie und dadurch eine Art Hibernationszustand erzeugt werden, also die physiologischen Vorgänge innerhalb des Gewebes auf reduziertem Niveau fortgesetzt werden. In der Organtransplantation findet das Prinzip des Vitalerhalts durch ECP bereits Anwendung (ROJAS-PENA *et al.* 2010; NICHOLSON UND HOSGOOD 2013; HOSGOOD UND NICHOLSON 2014).

4.2 LITERATURÜBERBLICK

Für den Literaturvergleich wurden die gängigen wissenschaftlichen Literaturdatenbanken (PubMed, Medline, Cochrane Library) nach den Stichworten: *ex vivo · extracorporeal · free flap · perfusate · tissue perfusion · transplantation · replantation · ischemia reperfusion damage*, oder Kombinationen daraus durchsucht. Miteingeschlossen in die Recherche wurden verwandte Artikel ("related articles", PubMed Suchmodus) zu allen relevanten Artikeln sowie die Sekundärzitate aus den relevanten Artikeln. Es wurden nicht nur Studien aufgeführt, bei denen ein extrakorporaler Kreislauf im engeren Sinne etabliert wurde, sondern auch solche, bei denen eine Infusion freier Gewebelöcke von Hand oder über einen Infusomaten erfolgte. Zudem finden Arbeiten Erwähnung, die sich mit dem *ex vivo* Vitalerhalt von Extremitäten beschäftigen, da diese, wie von einigen Autoren rechtfertigend angemerkt (MAYER *et al.* 1992b; DRAGU *et al.* 2010), im weitesten Sinne als zusammengesetzte, osteomyokokutane Lappen betrachtet werden können. Eine detaillierte Zusammenfassung über die bisherigen Arbeiten auf dem Gebiet der extrakorporalen Gewebepерfusion findet sich in Tabelle 4.1 im Anhang auf Seite 158.

4.2.1 TIEREXPERIMENTELLE ERFAHRUNGEN

Bereits in den 60er und 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden Blutperfusionsstudien zur Untersuchung physiologischer Aspekte amputierter Extremitäten durchgeführt (DELORME *et al.* 1964a; DELORME *et al.* 1964b; O'DONOVAN *et al.* 1976). Infolge dieser Experimente wurden Extremitäten vor einer Replantation ausgewaschen (ARAI *et al.* 1993), gelagert (ROSEN *et al.* 1987; KOUR *et al.* 1995; NORDEN *et al.* 1997), intermittierend (USUI *et al.* 1985) oder kontinuierlich (HICKS *et al.* 1980; USUI *et al.* 1985; TSUCHIDA *et al.* 2003) mit unterschiedlich zusammengesetzten Lösungen wie Kochsalzlösung (MEHL *et al.* 1964), Ringer-Laktat (HICKS *et al.* 1980), Mannitolhaltigen Lösungen (DOMINGO-PECH *et al.* 1991) oder mit klassischen, zur Organerhaltung konzipierten Lösungen wie „University of Wisconsin“ (UW) Lösung (KURODA *et al.* 1992; YLAND *et al.* 1996; NORDEN *et al.* 1997; TSUCHIDA *et al.* 2001; TSUCHIDA *et al.* 2003) oder „Eurocollin's“ Lösung (EC) (HICKS *et al.* 1980; KURODA *et al.* 1992; ARAI *et al.* 1993; TSUCHIDA *et al.* 2001) perfundiert (z.i. CONSTANTINESCU *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde die Verwendung artifizieller Sauerstoffträger wie Fluorocarbon (USUI *et al.* 1985) und Fluosol (USUI *et al.* 1985; ROSEN *et al.* 1987; YABE *et al.* 1994) untersucht.

In den neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde von mehreren Arbeitsgruppen der Einfluss einer kurzen *ex vivo* Infusion freier Gewebelöcke mit heparinisierem Vollblut auf die Ischämietoleranz der Gewebe untersucht (COOLEY *et al.* 1990; LI *et al.* 1993; LI *et al.* 1995; FOWLER *et al.* 1999). Eine 10 bis 30-minütige Infusion mit heparinisierem Vollblut in der Mitte einer 30-stündigen Ischämieperiode konnte den Ischämieschaden replantierter epigastrischer Lappen in der Ratte im Vergleich zu nicht infundierten Kontrollen signifikant verringern (COOLEY *et al.* 1990). Diese Beobachtung konnte später für reine Muskellappen im Rattenmodell durch Messung der Muskelenzyme bestätigt werden (LI *et al.* 1993). Die Autoren führen dies auf eine protektive Wirkung des Heparins zurück. Der positive Effekt auf die Ischämietoleranz sei mit der Wirkung einer präinterventionellen Heparinisierung vergleichbar (LI *et al.* 1995) und scheint in Kombination mit Citrat einen synergistischen Effekt auf die Reduktion des Ischämischadens zu haben (FOWLER *et al.* 1999). Der exakte Zeitpunkt der Infusion hingegen scheint von untergeordneter Bedeutung (LI *et al.* 1995). Diese Erfahrungen haben Eingang in die klinische Anwendung bei mikrochirurgischem Gewebetransfer gefunden und werden in unserer Abteilung in Form einer Spülung des Lappens mit heparinierter Ringer-Lösung unmittelbar nach Absetzen des Gefäßstiels, und Gabe von 5000 IE Heparin s.c. unmittelbar nach Beendigung der Anastomose und Freigabe des Blutflusses umgesetzt.

Masami MAEDA demonstrierte 1993 erstmals die Möglichkeit der Transplantation mikrovaskulärer Lappen ohne Gefäßanschluss durch vorübergehende extrakorporale Vitalerhaltung. Drei Jahre zuvor hatte seine Arbeitsgruppe als gedankliche Vorarbeit den Einfluss einer kon-

tinuierlichen arteriellen Infusion antithrombotischer Substanzen (Heparin, Urokinase und Prostaglandin E₁) auf das Überleben epigastrischer Lappen im Kaninchenmodell untersucht (MAEDA *et al.* 1990). Die kontinuierliche Infusion erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen über einen Katheter, der über die A. femoralis retrograd in die Bauchorta vorgeschoben worden war. Auf diese Weise vorbehandelte Lappen wiesen nach Transplantation auf die Gegenseite eine signifikant höhere Einheilrate auf als nicht vorbehandelte Kontrolllappen oder Lappen, bei denen die antithrombotische Therapie intravenös verabreicht worden war. Die durch die intraarterielle Infusion erzielte, „quasi“ lokale Anwendung, ermögliche nach Aussagen der Autoren höhere Wirkstoffkonzentrationen vor Ort bei Reduktion der Dosis, wodurch Nebenwirkungen verringert werden könnten (MAEDA *et al.* 1990).

Das Prinzip der extrakorporalen Perfusion von Gewebetransplantaten untersuchte die Arbeitsgruppe um MAEDA an venösen Lappen im Kaninchenmodell, wobei ein besonderer Fokus der Arbeit auf den Einfluss verschiedener Perfusate und auf die Qualität des Wundbetts gelegt wurde (MAEDA *et al.* 1993). Die Lappen wurden als 4 x 3 cm große venöse Durchflusslappen mit der V. thoracicoepigastrica dorsalis Durchflussvene gehoben. Die Vene wurde kaudal kanüliert und mit einer Infusionspumpe verbunden, die das Perfusat mit einem Volumen von 5 ml/h kontinuierlich (laminar) in die Vene infundierte. Der Abfluss des Perfusats erfolgte kranial über die Vene in den Körperkreislauf. Als Perfusate wurden stabilisiertes Hämoglobin, Ringer-Laktat, Vollblut oder Plasma für die Perfusion von je fünf Lappen verwendet. Auf diese Weise wurden die Lappen für drei Tage bei gutem Wundbett, und für sieben Tage bei kompromittiertem Wundbett perfundiert. Ein kompromittiertes Wundbett wurde simuliert, indem eine Polyethylenfolie zwischen Lappen und Wundbett gelegt wurde. Alle Lappen, die mit Plasma perfundiert wurden und auf ein gutes Wundbett zurückgreifen konnten, überlebten nach distaler und proximaler Ligatur der versorgenden Vene, während die Wahl eines anderen Perfusats oder das Vorliegen eines kompromittierten Wundbetts in allen Fällen zu einer Nekrose führte. Sofortige proximale und distale Ligatur der Vene (Kontrollgruppe, n=10) führte ebenfalls zu einer Totalnekrose. Die Arbeit von MAEDA *et al.* ist in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert. Das Prinzip venöser Lappen war zu dem Zeitpunkt bekannt und wurde bereits klinisch eingesetzt (FUKUI *et al.* 1989). MAEDA *et al.* demonstrieren mit diesem Modell jedoch erstmals die Möglichkeit der Verpflanzung mikrovaskulärer Transplantate ohne den bisher erforderlichen Gefäßanschluss (streng genommen wird in ihrem Setup ein venöses Anschlussgefäß benötigt, um den Abfluss sicherzustellen). Es wird kein geschlossener, abgekoppelter Kreislauf hergestellt, sondern der Abfluss erfolgt über eine Durchflussvene direkt in den Systemkreislauf. Die Verwendung eines justierbaren extrakorporalen Perfusionssystems ermöglichte die Perfusion mit arterialisiertem (bzw. oxygeniertem) Perfusat bei venösen, oder nur allmählich bis auf arterielle Werte ansteigenden Drü-

cken, wodurch eine mechanische Schädigung der Durchflussvene vermieden werden konnte. Eine vorherige Arterialisierung der Vene war daher nicht nötig. Durch die Möglichkeit der extrakorporalen Verpflanzung venöser Lappen vergrößert sich das Arsenal verfügbarer Gewebe. Das von den Autoren verwendete Setup mit einer in den Systemkreislauf drainierenden Vene wirft jedoch Fragen bezüglich der Sicherheit des Systems bei der klinischen Anwendung auf (Sepsisgefahr!). Eine weitere wichtige Beobachtung, die sich aus den Ergebnissen der Studie ableiten lässt, ist die Tatsache, dass ein geeignetes Wundbett Grundvoraussetzung für den Erfolg einer *ex vivo* Einheilung zu sein scheint. Sollte sich diese These bestätigen, hätte dies weitreichende Folgen für das von uns angestrebte Ziel der freien Transplantation bei voroperierten, bestrahlten Patienten. Relativierend muss jedoch eingewandt werden, dass die Einlage einer impermeablen Polyethylenfolie zur Simulation eines kompromittierten Wundbetts nicht mit der klinischen Situation vergleichbar ist. Da dadurch eine Gefäßaussprossung aus dem Wundgrund vollständig unterbunden wird, kann die Revascularisierung ausschließlich über den Randbereich der Wunde erfolgen. Darüber hinaus wurde das Perfusionssystem im Falle kompromittierter Wundbetten nach sieben Tagen abgestellt. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass eine Einheilung nach einer längeren Perfusionsdauer auch in kompromittierten Wundbetten möglich ist.

YABE *et al.* (1994) perfundierten die hinteren Gliedmaßen von Kaninchen für drei bzw. sechs Stunden mit einem künstlichen Sauerstoffträger (Fluorocarbon, FC-43) nach Abwarten eines einstündigen Ischämieintervalls. Im Vergleich zu nicht-perfundierten Kontrollen und hypotherm (4°C) gelagerten Kontrollen wiesen extrakorporal perfundierte Gliedmaßen normale Muskelfasern, normales Gefäßendothel und hohe ATP-Werte auf. Auf elektronenmikroskopischer Ebene zeigten sich jedoch auch bei Verwendung von Fluorocarbon als Perfusat ischämietypische Veränderungen wie eine mitochondriale Schwellung.

In einer aktuellen Studie wurden verschiedener Blutersatzlösungen zur normothermen, extrakorporalen Perfusion epigastrischer Fettlappen im Rattenmodell über bis zu zehn Tage verwendet (HEROLD *et al.* 2009). Der Erfolg der Perfusion wurde durch den Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) im Perfusat und durch histologische Untersuchungen nach Beendigung der Perfusion beurteilt. Die LDH als intrazelluläres Enzym wird im Rahmen von Zellysevorgängen bei ischämischem Gewebeuntergang freigesetzt. Da die Halbwertszeit der LDH bei nur ca. 24 Stunden liegt, argumentieren die Autoren, dass eine fortgesetzte Produktion dieses Enzyms über einen Zeitraum von zehn Tagen ein Marker dafür sei, dass in dem [ischämisch] geschädigten Gewebe noch lebende Zellen vorzufinden sind. Die Perfusion mit Hannover'scher Lösung war der Perfusion mit Eurocollin's Lösung und nicht perfundierten Kontrollen überlegen. Eurocollin's Lösung sei nach Angaben der Autoren für die normotherme extrakorporale Gewebepfusion ungeeignet (HEROLD *et al.* 2009).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie stellten WÖRNER *et al.* (2014) ein extrakorporales Perfusionssystem für die normotherme, pulsatile Perfusion von Kleintierorganen mit autologem Vollblut vor. Mit diesem System war die *ex vivo* Perfusion mit heparinisiertem Vollblut in vier von sieben epigastrischen Lappen im Kaninchenmodell über einen Zeitraum von fünf Tagen möglich. In den anderen drei Lappen war es zu einem Perfusionsstopp gekommen, so dass sich die Lappen selbst manuell nicht mehr anspülen ließen. Zudem beobachteten die Autoren Hämorrhagien aus den Lappen. Mit dem gleichen System war es der Arbeitsgruppe zudem möglich Kaninchennieren über 24 (n=6) bzw. 48 (n=2) Stunden vital zu erhalten. Als Zeichen einer aufrechterhaltenen Funktion wurde eine Urinproduktion zwischen 100 und 180 ml beobachtet (WÖRNER *et al.* 2014). Die Autoren heben den Stellenwert ihres Kleinvolumenperfusionsgeräts für den Vitalerhalt von Organen vor Transplantation und für das Tissue Engineering vaskularisierter Gewebe, wie die Perfusion dezellularisierter Organe, hervor.

Auch im Großtiermodell fand das Prinzip der extrakorporalen Gewebepерfusion bereits Anwendung. Analog zu YABE *et al.* (1994) untersuchte die Arbeitsgruppe um Masamichi USUI (USUI *et al.* 1978; USUI *et al.* 1983; MURAMATSU *et al.* 1985) den Einfluss artifizierlicher Sauerstoffträger auf die Ischämietoleranz zusammengesetzter Gewebe. Mitte der Neunzehnhundertachtziger Jahre verglichen die Autoren Fluorocarbon (FC-43, verdünnt mit Ringer-Lösung auf 10% (w/v)) und reine Ringer-Lösung bei der Perfusion der hinteren Gliedmaßen von Hunden über ein Zeitintervall von sechs Stunden bei verschiedenen Temperaturen (0°C, 21°C) (USUI *et al.* 1985). Die Gliedmaßen wurden anschließend wieder replantiert und für sechs Stunden beobachtet. Alle Hunde bei denen die replantierten Gliedmaßen bei 0°C gelagert worden waren überlebten, unabhängig von der verwendeten Methode (keine Perfusion, intermittierende oder kontinuierliche Perfusion mit FC-43, kontinuierliche Perfusion mit Ringer). Etwa die Hälfte der Hunde verstarb infolge des Reperfusionsschadens nach Replantation nicht perfundierter, bei Zimmertemperatur gelagerter Amputate. Die Perfusion mit FC-43 steigerte die Überlebensrate auf knapp 90%. Die Perfusion mit reiner Ringer-Lösung führte zu einer massiven Gewichtszunahme bis 50% durch interstitielle Ödembildung, weshalb eine Replantation in dieser Gruppe unterlassen wurde. Bei Verwendung des 10%igen Fluorocarbonmischs, dem zusätzlich ein geringer Prozentsatz Hydroxethylstärke beigemischt wurde, war die Gewichtszunahme signifikant geringer (knapp 29%). Mit konstanten Kalium- und Laktatwerten und einem im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigeren Muskelenzymanstieg ließen sich die besten Ergebnisse bei kontinuierlicher Perfusion mit FC-43 bei 0°C beobachten. Eine intermittierende Perfusion zeigte ähnliche Ergebnisse wie eine ausbleibende Perfusion (Ischämie) über den selben Zeitraum und wird daher von den Autoren nicht empfohlen.

DOMINGO *et al.* (1991) perfundierten die hinteren linken Gliedmaßen von insgesamt 15 Hunden mit hochverdünntem heparinisiertem Vollblut mit zugesetztem Bicarbonat-Puffer (27,5% Vollblut, 27,5% Ringer-Laktat, 20,6% Rheomacrodex, 13,7% Mannitol, 10,3% Natriumbicarbonat). Sechs Gliedmaßen der auf diese Weise perfundierten Gliedmaßen wurden nach 24-stündiger Perfusion replantiert. Wie in den zuvor erwähnten Studien von USUI *et al.* konnte der Replantationserfolg jedoch nicht klinisch untersucht werden, da die Hunde bereits nach sechs Stunden euthanasiert wurden. Als Kontrollen dienten die hinteren linken Gliedmaßen von weiteren sechs Hunden, die unmittelbar nach Amputation replantiert wurden. Die Autoren beobachteten in den Kontrollen erhöhte Muskelenzyme (GOT, CK). In den perfundierten Gliedmaßen wurden ausgeprägte interstitielle Ödeme beobachtet (Gewichtszunahme 20–50%), die Muskelfaserarchitektur war histologisch jedoch weitgehend erhalten.

GORDON *et al.* (1992) perfundierten sechs amputierte hintere Gliedmaßen von Hunden mit der kardioplegischen University of Wisconsin Lösung (UW) pulsatil über einen Zeitraum von zwölf Stunden bei 13°C. Den „bioenergetischen Status“ der Gliedmaßen überwachten die Autoren durch magnetresonanzspektroskopische Messung der Muskelenzyme Adenosin-Triphosphat (ATP) und Phosphokreatinin sowie durch Bestimmung des pH-Wertes im Gewebe. Zur Beurteilung ischämischer Gewebeschäden schlossen sich histologische Untersuchungen an. Im Vergleich zu nicht-perfundierten, kühlgelagerten Gliedmaßen war der Abfall der Stoffwechselfparameter und die Übersäuerung des Gewebes während hypothermer, pulsatiler, extrakorporaler Perfusion deutlich verlangsamt. In einem Fall wurde sogar ein Anstieg des Phosphokreatinins beobachtet. Den fehlenden Anstieg in den anderen perfundierten Extremitäten führten die Autoren auf Mikroembolisationen und Schädigungen des vaskulären Systems im Rahmen der Amputationen zurück, wodurch das Perfusat nicht mehr alle Bereiche des Lappens erreichen konnte.

Die Berliner Arbeitsgruppe um den HNO-Arzt Berndt MAYER beschäftigte sich Anfang der Neunzigerjahre des letzten Jahrhunderts an der Freien Universität Berlin ausführlich mit der Problematik des Vitalerhalts freier Lappen mit Hilfe extrakorporaler Perfusion im Großtiermodell (MAYER *et al.* 1992b; MAYER *et al.* 1992c; KAISER *et al.* 1993; MAYER *et al.* 1994; MAYER 1998; MAYER 2002). Mit Hilfe eines aus der Organtransplantation entliehenen und speziell für die „besonderen Verhältnisse freier Lappen“ (MAYER *et al.* 1992b) modifizierten extrakorporalen Perfusionssystems gelang es der Arbeitsgruppe gemischt-osteomyokutane Lappen über einen Zeitraum vital zu erhalten, der die zeitlichen Möglichkeiten der kalten Lagerung um ein Vielfaches überschreitet. MAYER *et al.* (1992b) verwendeten ein von VON BAEYER ursprünglich für die warme Nierenperfusion entwickeltes und patentiertes System. Als osteomyokutanes Lappenmodell dienten die Vorfüße von 15 Schweinen. Als Perfusat diente MCDB-153 Medium, ein Basalmedium für die Anzucht monoklonaler Keratinozyten. Die Perfusion

erfolgte bei Zimmertemperatur (21°C). Das System funktionierte nach dem Dialyseprinzip und bestand aus zwei Kreisläufen, einem Ernährungskreislauf über den Perfusat in den Lappen gelangte und ein Oxygenierungs- und Reinigungskreislauf. Die Oxygenation des Perfusats erfolgte über einen Hämofilter mit Polysulfon-Membran. Über den zweiten Kreislauf wurde als Dialysat oxygenierte physiologische Ringer-Laktat-Lösung durch den Hämofilter gepumpt. Auf diese Weise war gleichzeitig die Dialyse und Oxygenation des Perfusats möglich. Als funktionellen Parameter zur Beurteilung der Vitalität diente die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs des Lappens pro Zeit durch Bestimmung der Sauerstoffdifferenz zwischen zu- und abfließendem Schenkel (MAYER *et al.* 1992b). Selbst nach siebentägiger extrakorporaler Perfusion beobachteten die Autoren (MAYER *et al.* 1992b; MAYER *et al.* 1993) noch einen Sauerstoffverbrauch im Gewebe, der mit Werten unmittelbar nach Hebung vergleichbar war. Ein mit dem gleichen experimentellen Setup, jedoch ohne Oxygenierung des Perfusats behandelter Lappen, war, nach Aussagen der Autoren nach 48 Stunden klinisch und pathologisch „tot“ (MAYER *et al.* 1992b). Der Sauerstoffverbrauch wurde mit 0,003 ml O₂/min/g bei Zimmertemperatur (21°C) angegeben. Das Hauptproblem der extrakorporalen Langzeitvitalerhaltung von Geweben sahen die Autoren in einer mikrobiellen Infiltration des Gewebes mit erhöhtem Infektionsrisiko (MAYER *et al.* 1994). Nach einwöchiger Vitalerhaltung waren lichtmikroskopisch in allen Gewebeschichten diffuse Bakterieninfiltrate zu sehen. MAYER und Kollegen planten als nächsten Schritt die Replantation eines wochenlang warm vital erhaltenen Schweinevorfußes und visierten eine spätere klinische Anwendung zur Gewebetransplantation ohne Gefäßstiel an (KAISER *et al.* 1993).

Aufgrund tierschutzrechtlicher Bestimmungen war es nicht gestattet die operierten Schweine mit amputiertem Vorfuß aus der Narkose aufwachen zu lassen. Deshalb war es der Arbeitsgruppe nicht möglich, die Replantation eines über diesen Zeitraum (168 Stunden, bzw. 7 Tage) extrakorporal vital erhaltenen Vorfußes zu überprüfen. Um dieses Problem zu umgehen etablierte die Arbeitsgruppe den Trapeziuslappen des Schweins als mykokutanes Lappenmodell (MAYER UND KAEMPFER 1996).

Um das Problem der mikrobiellen Besiedelung zu lösen, entwickelte die Arbeitsgruppe eine neue, geschlossene, elektronisch gesteuerte, vollautomatisierte Apparatur mit Bakterienfiltern und einem zusätzlichem Spül-Reinigungskreislauf (MAYER *et al.* 1994). Das Perfusionsystem arbeitete weiter nach dem Dialyseprinzip und bestand nun aus drei Kreisläufen: einem Versorgungskreislauf, einem Oxygenierungskreislauf und einem zusätzlichen dritten Kreislauf mit isotonischer Spülflüssigkeit (Ringer-Laktat), der ein Antibiotikum (Gentamycin) und ein Antimykotikum (Amphotericin B) zugesetzt waren. Dieser Reinigungskreislauf schaltete sich periodisch zu und war zeitlich so mit dem ersten Kreislauf getaktet, dass sich die Flüssigkeiten nicht vermischen konnten. Die Lappenperfusion war druck- und volumenge-

steuert (MAYER *et al.* 1994). Mit diesem System demonstrierten sie in einer Einzelfallbeschreibung die Einheilung eines mikrovaskulären Trapeziuslappens im Schwein nach siebentägiger extrakorporaler Vitalerhaltung und anschließender Replantation durch Anschluss an A. transversa colli und V. jugularis externa der Gegenseite (MAYER *et al.* 1994). Dabei stellten die Autoren fest, dass die Muskelkomponente wesentlich zuverlässiger einheilte als die Haut (MAYER *et al.* 1994).

Zehn Jahre später untersuchte die Arbeitsgruppe um MAYER erneut die Zuverlässigkeit ihres weiterentwickelten ECP-Systems an muskulokutanen, vertikalen Trapeziuslappen in sechs Landschweinen mit analogem Versuchsaufbau (MAYER 2002). Sie kamen zu dem Erkenntnis, dass eine warme Vitalerhaltung über einen Zeitraum von mindestens 46 Stunden durch ECP möglich ist. Die Sauerstoffdifferenz als Parameter eines funktionierenden Zellstoffwechsels war auch nach diesem Zeitraum noch mit den Ausgangswerten nach Hebung vergleichbar (MAYER 2002). Zwischen der 47. und 98. Stunde trat eine Kreislaufdekompensation oder Kreislaufinsuffizienz auf, die zum Versuchsabbruch führte (MAYER 2002). Ein Vitalerhalt über dieses Zeitintervall hinaus war nur in Einzelfällen möglich (MAYER *et al.* 1994). Untersuchungen an den Lappen nach Kreislaufdekompensation oder -insuffizienz zeigten einen Perfusionsstopp in Teilen des Lappens sowie Endothelläsionen und vereinzelte Embolisationen mit Bakterienhaufen (MAYER 2002). Ein Fortführen der Perfusion über diesen Zeitraum hinaus führte zu einem Absterben der Lappen (MAYER 2002). Ab der 72. Stunde wurde trotz Verwendung eines geschlossenen Systems eine Keimbesiedelung der Lappen in der Organ-kammer festgestellt (z.i. MAYER 2002). Diese „massive mikrobielle Kontamination des Gewebes“ (KAISER *et al.* 1993) und das damit verbundene hochgradige Infektionsrisiko stellte das Hauptproblem des warmen Vitalerhalts von Gewebetransplantaten dar (MAYER 2002). Da zudem eine zuverlässige Funktion von 168–240 Stunden notwendig wäre, um einen Lappen beim Menschen ohne entsprechenden Gefäßanschluss zu verpflanzen, sei das System klinisch noch nicht eingesetzt worden (MAYER 2002). Das von MAYER *et al.* (2002) beschriebene *in vitro* System zur extrakorporalen Perfusion und Vitalerhaltung von freien Gewebetran-plantaten entwickelte und patentierte System wird jedoch mittlerweile in der Biotechnologie und pharmazeutischen Industrie zur Untersuchung der Pharmakodynamik und Toxikologie bei der perkutanen Resorption von Medikamenten eingesetzt (NOGUEIRA *et al.* 1999; WAGNER *et al.* 2003).

Die Erlangerer Arbeitsgruppe um den plastischen Chirurgen Adrien DRAGU griff die Versuche von MAYER *et al.* (2002) zehn Jahre später wieder auf und verwendete die extrakorporale Gewebepfusion als Forschungsmodell, um die Vorgänge im Gewebe während Ischämie und Reperfusion zu untersuchen (DRAGU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014). Bereits im Vorfeld hatten sich die Autoren mit den biochemi-

schen Vorgängen während Ischämie und Reperfusion freier Lappen auseinandergesetzt (DRAGU *et al.* 2011a; DRAGU *et al.* 2011b). Mit der Zielsetzung, die Ischämiezeit durch warme Vitalerhaltung zu überbrücken, verwendeten DRAGU *et al.* analog zu MAYER *et al.* Muskellappen von Schweinen (2010; 2012a; 2012b; TAEGER *et al.* 2014). Abweichend kam jedoch mit dem M. rectus abdominis ein reiner Muskellappen zum Einsatz. In einer ersten Pilotstudie ließen sich über einen Zeitraum von 120 Minuten stabile Drücke während der Perfusion von fünf Muskellappen mit einem für diese Zwecke entwickelten miniaturisierten Perfusionsystem aufrecht erhalten (DRAGU *et al.* 2010). Als Perfusat verwendeten die Autoren eine kristalloide Infusionslösung (Jonosteril[®], Fresenius Kabi GmbH).

In zwei Folgestudien verglichen DRAGU *et al.* (2012a; 2012b) Vollblut und Jonosteril[®] als Perfusate für die kurzzeitige Perfusion (60 min) von fünf Rectus-abdominis-Lappen im Schweinemodell. Die Anwendung kristalloider Lösungen wird aufgrund fehlender Hämorrhagien und Koagulationsneigung als komfortabler bezeichnet. Auch habe die Verwendung von Vollblut keinen zusätzlichen protektiven Einfluss auf den Lappen. Wie die Autoren selbst einschränkend angemerken, wurde in keiner der Studien ein Oxygenator verwendet. Kontinuierliche Sauerstoffmessungen im perfundierten Gewebe durch Fluoreszenzlöschung („dynamic quenching models“) weisen jedoch eindeutig auf die Notwendigkeit einer zusätzlichen Oxygenierung hin (DRAGU *et al.* 2012b). So fiel der Sauerstoffgehalt im Gewebe ohne zusätzliche Oxygenierung rasch ab, bei Verwendung von Jonosteril[®] ohne zusätzliche Oxygenierung im venös zurückfließenden Blut sogar bis auf Null. Dies spreche dafür, dass in dem Gewebe eine Sauerstoffunterversorgung vorgelegen habe (DRAGU *et al.* 2012b). Hatte das Perfusat (Vollblut oder Jonosteril[®]) hingegen Kontakt zu Raumluft, z.B. indem aus dem Lappen ausgetretenes Blut zurück in das Reservoir gegeben wurde oder das Perfusat vollständig ausgetauscht wurde, kam es zu einem signifikanten Sauerstoffanstieg im Gewebe (DRAGU *et al.* 2012b). Ob die Verwendung von Vollblut in Kombination mit zusätzlicher Oxygenation anderen Perfusaten überlegen ist, wird von den Autoren leider nicht weiter untersucht.

Die Notwendigkeit einer zusätzlichen Oxygenierung wird in einer weiteren, aktuellen Studie derselben Arbeitsgruppe bestätigt (TAEGER *et al.* 2014). Unter Verwendung des oben beschriebenen experimentellen Modells untersuchten die Autoren die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1- α und des pro-apoptotischen Proteins Caspase-3 im Gewebe während 60-minütiger extrakorporaler Perfusion. Als Perfusate wurden eine kardioplegische Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat, HTK) und eine kristalloide Lösung (Jonosteril[®]) verglichen. Eine Gruppe (n=5) wurde mit HTK perfundiert, jedoch nicht oxygeniert. Ein Gruppe (n=5) wurde initial mit HTK gespült und dann unbehandelt gelassen. Zwei weitere Gruppen wurden entweder mit HTK (n=5) oder Jonosteril[®] (n=5) perfundiert und oxygeniert. Als Kontrolle dien-

ten vier unbehandelte Lappen. Alle behandelten Lappen wiesen signifikant niedrigere Caspase-3 Level, und, außer nach einmaliger Spülung, wiesen auch alle Gruppen signifikant niedrigere HIF-1- α Level als unbehandelte Kontrollen auf. Nach einmaliger Spülung mit HTK, wie in der klinischen Praxis üblich, waren die HIF-1- α und Caspase-3 Werte signifikant höher als in den perfundierten Gruppen. Während in oben erwähnter Studie die Verwendung von kristalloider Lösung zu einem Anstieg der Ischämie marker geführt hatte (DRAGU *et al.* 2012a), führte die zusätzliche Oxygenierung in dieser Studie sogar zu einem Absinken von HIF-1- α und Caspase-3 bei Verwendung kristalloider Lösung.

CONSTANTINESCU *et al.* (2010) präservierten amputierte vordere Gliedmaßen von Schweinen erfolgreich für zwölf Stunden mit Hilfe extrakorporaler Vollblutperfusion und untersuchten den Einfluss dieser Methode auf die Elektrolytzusammensetzung innerhalb der Extremitätenmuskulatur. Der pH-Wert blieb während der zwölfstündigen Perfusionszeit konstant, wobei es initial zu einem erhöhten Laktatanstieg kam. Das Kaliumlevel hielten die Autoren durch Gabe von Insulin und Glukose aufrecht. Im Gegensatz zu den Gliedmaßen der Kontrollgruppe, die einer kalten Ischämie (4 °C) ausgesetzt waren, ließen sich in den extrakorporal perfundierten Gliedmaßen durchgehend elektrische Muskelantworten als Zeichen einer erhaltenen Muskelfunktion auslösen. Histologisch fanden die Autoren nach zwölfstündiger Perfusionszeit nur gering ausgeprägte strukturelle Veränderungen, wobei sich histologisch und in der Immunfluoreszenzanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen perfundierten und auf 4°C gekühlten Extremitäten zeigte. Nach anfänglich enttäuschenden Erfahrungen mit normotonen Drücken reduzierten CONSTANTINESCU *et al.* (2010) den Perfusionsdruck auf die Hälfte der *in vivo* gemessenen physiologischen Drücke, um eine Druckschädigung des mikrovaskulären Systems mit konsekutiver Extravasation, Ödembildung und Erhöhung der Compartmentdrücke zu vermeiden.

Die Berner Arbeitsgruppe um Mihai CONSTANTINESCU verwendeten das von ihnen entwickelte Perfusionssystem in einer sehr interessanten Folgestudie für Untersuchungen des Ischämie-/Reperfusionsschadens im selben Tiermodell (MULLER *et al.* 2013). Die Perfusion der insgesamt 32 Schweinevorderbeine erfolgte analog zur Vorstudie mit heparinisiertem Vollblut mit einem Blutflussvolumen von 100–150 ml/min bei 32°C und 21% Sauerstoffpartialdruck (Umgebungsluft). Kalium- und pH-Wert wurden, analog zur Vorstudie, durch Zugabe von Glukose und Insulin zum Perfusat konstant gehalten. Als Besonderheit im Versuchsaufbau ist zu erwähnen, dass die ECP nach einer Ischämiephase von sechs bzw. zwölf Stunden zeitverzögert gestartet wurde, um die klinische Situation einer verzögerten (6 h) bzw. stark verzögerten (12 h) Reperfusion nach Amputation zu simulieren. Als weitere Besonderheit dieser Studie ist zu erwähnen, dass die amputierten und extrakorporal perfundierten Gliedmaßen in zwei Versuchsgruppen (keine Ischämie/ 12 h Perfusion und 6 h Ischämie/ 12 h

Perfusion) anschließend wieder replantiert und über sieben Tage klinisch nachbeobachtet wurden. Als Kontrolle dienten jeweils die kontralateralen Gliedmaßen. Zur Beurteilung des Ischämie-/Reperfusionsschades wurden Entzündungsmarker, wie Komplementfaktoren in Serum und Gewebe, Interleukine und TNF- α und Immunglobuline immunfluoreszenzmikroskopisch und mit Hilfe von Immunassays bestimmt. Die Autoren beschreiben einen geringen Ischämie-/Reperfusionsschaden in der Skelettmuskulatur perfundierter Extremitäten. Auch nach Replantation zeigte sich histologisch im Vergleich zur Gegenseite keine erhöhter Ischämieschaden. Die Endothelzellintegrität, beurteilt durch eine konstante Expression der in Endothelzellen enthaltenen Faktoren Heparinsulfat-Proteoglycan (HSPG) und von Willebrand Faktor (vWF), blieb erhalten. Die Komplementaktivität im Serum fiel mit Beginn der Perfusion nahezu auf Null und blieb während des gesamten Perfusionsintervalls auf niedrigem Niveau. Nach Replantation stieg die Komplementaktivität wieder auf das Ausgangsniveau. In allen Gruppen kam es während extrakorporaler Perfusion zudem zu einem Cytokinanstieg (IL-6, IL-9). Nach Replantation fielen auch diese Werte wieder auf Ausgangsniveau. Die Autoren schlussfolgern, dass die ECP eine verlängerte Präservierung amputierter Körperteile ermöglichte und der Einfluss auf eine Reperfusionsschädigung der Gewebe vernachlässigbar sei. Allerdings werden keine Angaben dazu gemacht, ob und inwieweit die replantierten Beine klinisch einheilten oder ob Komplikationen wie Infektionen beobachtet wurden.

4.2.2 KLINISCHE ANWENDUNG

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Transplantation von Gliedmaßen (MACHENS 2008) gemacht und selbst Gesichtstransplantationen sind heute möglich (PETRUZZO *et al.* 2012). Dennoch ist die Durchführung solcher Operationen auf Einzelfälle in speziellen Zentren beschränkt, was zum Teil an zeitlichen Faktoren liegt, durch die die Haltbarkeit solcher Transplantate eingeschränkt wird. So müssen abgetrennte Körperteile innerhalb von 4–6 Stunden revaskularisiert werden, um irreversible Gewebeschäden und einen ausgedehnten postischämischen Reperfusionsschaden zu verhindern. Die vorübergehende *ex vivo* Perfusion von Nieren mit anschließender erfolgreicher Transplantation wurde bereits klinisch demonstriert (NICHOLSON UND HOSGOOD 2013; HOSGOOD UND NICHOLSON 2014). Die Arbeitsgruppe um MAYER äußerte Anfang der Neunzigerjahre des letzten Jahrhunderts die Absicht eine Transplantation von extrakorporalen Gewebetransplantaten beim Menschen durchzuführen (KAISER *et al.* 1993), sah jedoch aufgrund einer im Tiermodell beobachteten „massiven bakteriellen Besiedelung“ von dieser Absicht ab (MAYER 2002).

Bereits 1964 beschrieben DELORME *et al.* (1964a; 1964b) die ECP mit heparinisierem Vollblut als Möglichkeit der Untersuchung (patho-) physiologischer Vorgänge in im Rahmen von Tumorresektionen amputierten menschlichen Extremitäten. Die Autoren beschreiben, dass sich dadurch die in Kontrollextremitäten nur über einen Zeitraum von einer Stunde messbare

Muskelantwort nach Nervstimulation aufrecht erhalten ließe. Einer beobachteten Ödemneigung und Erhöhung des peripheren Widerstands durch Veränderungen des Perfusats (Vollblut) nach längeren Perfusionen wirkten die Autoren durch Beimischung von Dextran entgegen.

GREANEY *et al.* (2010) beschreiben in dem bisher klinisch einzigen Fallbericht die Verwendung einer extrakorporalen Membranoxygenations-Einheit (ECMO) als eine Methode zur Überbrückung der Ischämiezeit von Extremitäten nach Amputationsverletzung. Die Autoren beschreiben den Fall einer jungen Patientin, der ein, im Rahmen eines Hochrasanztraumas amputierter Arm, replantiert werden sollte. Wegen einer zunehmenden Koagulopathie und Hypothermie musste nach erfolgter Wiederherstellung der vaskulären Anatomie die Nerven- und Muskelwiederherstellung verschoben werden. Aufgrund des zunehmend instabilen Zustandes der Patientin und des persistierenden Blutverlustes aus den Wundflächen der replantierten Extremität, sah sich das Team nach drei Tagen gezwungen, die versorgenden Armgefäße erneut abzuklemmen. Um die Extremität dennoch erhalten zu können schlossen sie eine ECMO an die zu- und abführenden Gefäße des Armes an und perfundierten den Arm für ca. 72 Stunden extrakorporal. Auf diese Weise blieben Hand und Finger perfundiert, was sich in einem guten kapillaren Refill zeigte. Da jedoch Teile des Ober- und Unterarms weiter mazerierten und sich infizierten, wurde jedoch letztendlich keine erneute Replantation durchgeführt (GREANEY *et al.* 2010).

4.3 ENTWICKLUNG DES VERWENDETEN SYSTEMS

Die aufgeführten Studien demonstrierten die Möglichkeit des temporären Vitalerhalts über einen extrakorporalen Kreislauf und lieferten erste wichtige Beobachtungen zu den (patho)physiologischen und biochemischen Vorgängen innerhalb des Gewebes während extrakorporaler Perfusion. In einer Studie konnte bereits das Prinzip der Einheilung kleindimensionierter, freier Lappen ohne Gefäßanschluss gezeigt werden (MAEDA *et al.* 1993).

Allerdings fehlt nach wie vor ein etabliertes Kleintiermodell zur Studie gemischtgewebiger Lappen während extrakorporaler Perfusion über einen vollständig abgekoppelten Kreislauf. MAEDA *et al.* (1990) beispielsweise leiten den venösen Abfluss in den Körperkreislauf, was gravierende Sicherheitsfragen hinsichtlich einer klinischen Anwendung aufwirft (Sepsisgefahr). Auch andere Autoren verwenden einen Versuchsaufbau, der auf einen eigenständigen Kreislauf verzichtet (COOLEY *et al.* 1990; LI *et al.* 1993; LI *et al.* 1995; FOWLER *et al.* 1999). In anderen Studien wird statt zusammengesetztem Gewebe ein Lappenmodell verwendet, das nur aus einem bradytrophem Gewebe (Fett) aufgebaut ist (WORNER *et al.* 2014), oder die Perfusionsintervalle werden so kurz gewählt, dass diese deutlich unter der Ischämietoleranzgrenze liegen (DRAGU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et*

al. 2014). Ein Teil der Studien verzichtet vollständig auf Kontrollgruppen (MAYER *et al.* 1994; MAYER 2002; DRAGU *et al.* 2010; GREANEY *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b) oder verwendet Kontrollen mit sehr geringer Stichprobengröße (MAYER *et al.* 1992c; TAEGER *et al.* 2014). Obwohl die Notwendigkeit einer Oxygenation in zahlreichen Studien hervorgehoben wurde (MAYER *et al.* 1992b; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014), verzichteten viele verwendete Perfusionsysteme auf eine zusätzlichen Oxygenation des Perfusats (HEROLD *et al.* 2009; DRAGU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b). Und obwohl in mehr als der Hälfte der Studien zur Thematik der extrakorporalen Gewebepfusion Vollblut oder Erythrozytenkonzentrate als Perfusat verwendet wird (siehe Tab. 4.1 im Anhang ab Seite 158), wurden die Hämolyseeigenschaften des Perfusionsystems nur von zwei Arbeitsgruppen überhaupt thematisiert (MAYER *et al.* 1992b; WÖRNER *et al.* 2014). Die Evaluation des Lappens während laufender extrakorporaler Perfusion beschränkt sich meist auf klinische Beobachtungen, Lappengewicht oder Messung der Sauerstoffdifferenz zwischen arteriellem und venösem Gefäß (COOLEY *et al.* 1990; FOWLER *et al.* 1999; DRAGU *et al.* 2010; WÖRNER *et al.* 2014). Der Großteil der Studien verzichtet zudem auf eine Replantation nach erfolgter extrakorporaler Perfusion (DELORME *et al.* 1964a; GORDON *et al.* 1992; MAYER *et al.* 1992b; LI *et al.* 1993; YABE *et al.* 1994; FOWLER *et al.* 1999; MAYER 2002; HEROLD *et al.* 2009; CONSTANTINESCU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2010; GREANEY *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014; WÖRNER *et al.* 2014) oder euthanasieren die Versuchstiere sechs Stunden nach erfolgter Replantation (MURAMATSU *et al.* 1985; USUI *et al.* 1985; DOMINGO-PECH *et al.* 1991), so dass der klinische Erfolg letztlich nicht eindeutig beurteilt werden kann.

Ziel unserer Arbeit war die Konstruktion einer miniaturisierten Perfusionsvorrichtung zur Perfusion mikrovaskulärer Transplantate und die Etablierung eines Kleintiermodells zur Studie der bisher wenig erforschten physiologischen und biochemischen Vorgänge innerhalb von Gewebetransplantaten während extrakorporaler Perfusion. Als Tiermodell entschieden wir uns für den epigastrischen Lappen der Ratte, einen faszio-lipo-kutanen „composite flap“, mit dem unsere Arbeitsgruppe bereits große Erfahrung gesammelt hatte (MÜCKE *et al.* 2011; MÜCKE *et al.* 2013; FICHTER *et al.* 2014). Der Zeitraum der Perfusion war so gewählt worden, dass er deutlich über dem Ischämietoleranzintervall (sechs Stunden) lag. Für eine wissenschaftlich fundierte Etablierung des Modells bzw. den Transfer der extrakorporalen Perfusion in ein bestehendes anerkanntes Lappenmodell war uns zudem wichtig, die Daten durch entsprechende Kontrollgruppen zu validieren.

Das System sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

- (1) Simulation möglichst physiologischer Bedingungen
- (2) Vermeidung einer Hämolyse
- (3) Vermeidung einer Aktivierung der Blutgerinnung
- (4) Vermeidung mikrobieller Besiedelung
- (5) kontinuierliche Dokumentationsmöglichkeit
- (6) mobiles Design und einfache Bedienung

Wie und inwieweit das von uns entwickelte System diese Voraussetzungen erfüllen konnte, und inwieweit dadurch das Ziel dieser Arbeit, der Vitalerhalt eines zusammengesetzten Lappens über ECP erreicht werden konnte, soll im Folgenden erörtert werden.

4.3.1 SIMULATION MÖGLICHST PHYSIOLOGISCHER BEDINGUNGEN

Bei der ECP von Geweben wird ein vom Rest des Körpers abgekoppeltes (künstliches) System aufgebaut. Diese Abkopplung vom Körperkreislauf bringt für das Gewebe einige wichtige Veränderungen mit sich, die bei der Planung eines solchen Systems berücksichtigt werden müssen. Wie sich diese Veränderungen im Einzelnen äußern und welchen Einfluss diese auf das abgekoppelte Gewebe während extrakorporaler Perfusion haben, ist bisher kaum erforscht. Umso wichtiger ist es daher möglichst physiologische Grundbedingungen zu schaffen. Folgende grundlegenden Körperfunktionen (vgl. KLINKE UND SILBERNAGEL 1996) müssen durch das System ersetzt werden:

- Atmung, also O₂-Zufuhr und CO₂-Abtransport
- Zu- und Abfuhr von Metaboliten, Elimination von Schadstoffen
- Aufrechterhalt des Säure-Basehaushalts
- Aufrechterhalt des Salz- und Wasserhaushalts
- Temperaturregulation
- Immunabwehr

Zu guter Letzt darf das perfundierte Gewebe nicht dauerhaft auf das abgekoppelte System angewiesen sein, sondern soll analog zur klinischen Situation (WOLFF *et al.* 2009; MÜCKE *et al.* 2012) möglichst bald vom versorgenden Gefäßstiel und damit vom Perfusionssystem unabhängig werden. Dazu muss also auch die Wundheilung in ihren Grundzügen aufrechterhalten werden und ein entsprechendes Milieu aufgebaut werden können, das ein Einwachsen neuer Gefäße aus dem umliegenden Gewebe ermöglicht. Neben diesen „Pflichten“ bietet das Phänomen des vom Körperkreislauf abgekoppelten Systems jedoch auch eine Reihe von Vorzügen, wodurch sich spannende neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, auf die im Kapitel „Ausblick“ ab Seite 132 genauer eingegangen werden soll.

4.3.1.1 Rolle des Perfusats

Das „Herzstück“ unseres Systems bildete eine Rollerpumpe, mit deren Hilfe der Transport des Perfusats ermöglicht wurde. Die Funktion der Atmung wurde durch einen Membranoxygenator verwirklicht, der wahlweise über Raumluft oder über Zufuhr von reinem Sauerstoff eine Oxygenation des Perfusats ermöglichte. Die Notwendigkeit einer zusätzlichen Oxygenation wurde in mehreren Studien hervorgehoben (MAYER *et al.* 1992b; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014). Eine Dialysefunktion zur Elimination von Schadstoffen war in unserem Setup nicht integriert, weshalb analog zu GORDON *et al.* (1992) regelmäßige Perfusatwechsel notwendig waren. Neben diesen technischen „Organen“ hat das Perfusat wohl den größten Stellenwert beim Aufrechterhalt der grundlegenden Körperfunktionen. Zur Simulation möglichst physiologischer Bedingungen fiel unsere Wahl auf Vollblut, das in der Herzchirurgie (HASSANEIN *et al.* 1998) und Organtransplantation (WORNER *et al.* 2014) weiterhin den Goldstandard darstellt. Vollblut verfügt über ein Sauerstofftransportsystem (Hämoglobin), über ausgeklügelte Puffersysteme (Bicarbonat, Phosphat, Proteinat) und ist auch ohne Anschluss an den Körperkreislauf in begrenztem Umfang immunologisch aktiv (zelluläres Immunsystem). Die Arbeitsgruppe um COOLEY, LI und FOWLER (COOLEY *et al.* 1990; LI *et al.* 1993; LI *et al.* 1995; FOWLER *et al.* 1999) zeigten in einer Reihe von Studien eine protektive Wirkung von antikoaguliertem Vollblut in Bezug auf die Vermeidung eines Ischämie-Reperfusionsschadens. WORNER *et al.* (2014) hielten Leistenlappen im Kaninchenmodell mit perfundiertem Vollblut über fünf Tage vital. Nach dreitägiger Perfusion mit autologem Vollblut beobachteten MAEDA *et al.* (1993) im Gegensatz zu den mit Ringer-Lösung perfundierten venösen Lappen im Kaninchenmodell einen weitgehend normalen strukturellen Aufbau. DRAGU *et al.* (2012a; 2012b) stellten hingegen im Vergleich zu kristalloider Lösung keinen zusätzlichen protektiven Vorteil von Vollblut fest und empfehlen aufgrund des leichteren Handlings daher kristalloide Lösungen als Perfusat. Allerdings ist der gewählte Perfusionszeitraum von nur einer Stunde zu kurz, um eine valide Empfehlung zu erlauben. Zudem verwendeten die Autoren keine Oxygenation, sodass eine der großen Stärken von Vollblut, dessen Sauerstofftransportkapazität, gar nicht genutzt werden konnte.

Ein weiterer, bisher in der Literatur unerwähnter, jedoch in Hinblick auf eine zukünftige klinische Umsetzung der extrakorporalen Gewebepfusion entscheidender Vorteil von Vollblut als Perfusatgrundlage liegt in der besseren klinischen Beurteilbarkeit des Gewebes: durch den roten Blutfarbstoff lässt sich eine aufrechterhaltene Perfusion bereits optisch durch die rosige Farbe des Transplantats und ein vorhandenes Rekapillarisierungsphänomen (Flush) beurteilen. Diese klinische Monitoringmöglichkeit entfällt bei alternativen Perfusaten wie kristalloiden Lösungen oder komplexen Blutersatzmedien. Auch viele gerätebasierte Monito-

ringoptionen, wie die in dieser Arbeit angewendete Gewebe-Photospektrometrie, basieren auf der Analyse des Hämoglobingehalts oder der Bewegung korpuskulärer Blutbestandteile.

Stellenwert der Oxygenation

Für den Erfolg einer Replantation ist letztlich eine möglichst rasche Reoxygenierung entscheidend. Die Zufuhr sauerstoffreicher Flüssigkeit mit hohem Sauerstoff-Volumenfluss wird für das Überleben des Gewebes höher eingestuft als die qualitative Zusammensetzung der Perfusionslösung (MAYER 1998). Unabhängig vom verwendeten Perfusat wurde daher die Notwendigkeit einer zusätzlichen Oxygenation in zahlreichen Studien hervorgehoben (MAYER *et al.* 1992b; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014). Dennoch verzichteten viele verwendete Perfusionssysteme auf eine zusätzlichen Oxygenation des Perfusats (HEROLD *et al.* 2009; DRAGU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b). Der von uns verwendete Membranoxygenator ist mit einer biopassiven Oberfläche beschichtet, die das Anheften von Thrombozyten und die Denaturierung von Proteinen reduziert – häufige Problemfaktoren bei Langzeit-ECMO Anwendung. Mit Hilfe dieses Oxygenators konnten, analog zu CONSTANTINESCU *et al.* (2010), selbst bei Raumluft (21% Sauerstoff) hochnormale Sauerstoffpartialdrücke und Sättigungswerte erzielt werden.

Potentielle Probleme bei der Verwendung von Vollblut

Trotz der offensichtlichen Vorteile bei der Verwendung von Vollblut müssen einige potentielle Gefahren, insbesondere die Blutgerinnung und die Hämolyse berücksichtigt werden. Beide Erscheinungen könnten für unser Vorhaben drastische Folgen haben. Beide Phänomene könnten zu einer Verlegung von Schläuchen oder Gefäßen und damit zum Perfusionsstopp im Lappen oder in Teilbereichen des Lappens durch Embolisation mit Zelldetritus, oder durch intravasale Gerinnung führen. Zudem stellt sich, gerade in dem von uns gewählten Kleintiermodell, die Frage nach der Verfügbarkeit von ausreichend autogenem Vollblut.

Der feine Grat zwischen Gerinnungs- und Blutungsrisiko

Eine Stase des Blutflusses im Schlauchsystem oder der Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen wie Silikonschläuche kann zu einer Aktivierung des Komplement- (THEIN *et al.* 2001) und Gerinnungssystems führen (GOLDSMITH UND TURITTO 1986). Diese Zellaktivierung wird sich bei Verwendung eines künstlichen Schlauchsystems nach heutigem Stand der Technik ohne Antikoagulation nicht vermeiden lassen. Auch bei Verwendung moderner Herz-Lungen-Maschinen ist daher eine Antikoagulation des Blutes erforderlich (ESPER *et al.* 2014). Die Antikoagulation in einem ECMO-System wird normalerweise durch Gabe eines Heparin-Bolus mit anschließender Heparininfusion erreicht. Die Heparinwirkung wird über regelmäßige PTT- und ACT-Messungen alle acht Stunden kontrolliert. Eine Heparinisierung kann jedoch das Ausmaß eines Reperfusionsschadens positiv beeinflussen (LI *et al.* 1995). Prä-

ischämische Heparinisierung führt bei vielen Geweben bzw. Organen, darunter Herz, Gehirn, Nieren, Muskel und auch Haut (WONG *et al.* 1991) zu einer erhöhten Ischämietoleranz (z.i. FOWLER *et al.* 1999). Heparin wird schnell in Endothelien aufgenommen und hat eine direkte protektive Wirkung auf diese während ischämischer Perioden (HIEBERT UND JAQUES 1976; HIEBERT UND LIU 1990), wobei die relative Signifikanz dieses Mechanismus im Vergleich zu den antikoagulativen Eigenschaften des Heparins noch untersucht werden muss (FOWLER *et al.* 1999). Im Vorfeld unserer Studie wurde bereits eine Vorläuferversion unserer Pumpe ähnlichen Aufbaus, die für die Perfusion von Organen im Kleintiermodell entwickelt worden war, auf deren Einfluss auf zirkulierendes humanes Vollblut hin, untersucht (THEIN *et al.* 2001). Während 90-minütiger Perfusion zeigte sich keine signifikante Aktivierung oder Zerstörung von Zellen (Gerinnung, Hämolyse) oder Faktoren (Komplementsystem). Da der untersuchte Zeitraum von 90 Minuten für unseren Versuchsaufbau zu kurz gewählt war, und daher nicht ausgeschlossen werden konnte, dass zu einem späteren Zeitpunkt potentiell nachteilige Blutveränderungen auftraten, führten wir an unserem System im Vorfeld eigene *in vivo* Untersuchungen an der Ratte und *in vitro* Untersuchungen mit murinem und humanem Vollblut durch. In einer Pilotstudie beobachteten wir nach Heparinisierung von murinem Vollblut unkontrollierte Blutungen aus der Peripherie des Lappens, wodurch eine Vitalerhaltung schon aufgrund des sich rasch aufbrauchenden Perfusats nicht über einen längeren Zeitraum sinnvoll durchführbar schien. Ein solcher unkontrollierter Blutaustritt wurde auch von anderen Autoren bei Verwendung von heparinisiertem Vollblut beobachtet (MAEDA *et al.* 1993; CONSTANTINESCU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012b; WORNER *et al.* 2014). CONSTANTINESCU *et al.* (2010) versuchten durch Beimischung von Methylprednisolon zum Perfusat diese kapilläre Leckage zu reduzieren. In unserer Studie führte eine Modifikation der Perfusatzusammensetzung durch Zugabe eines Plasmaexpanders und die Reduktion der Heparindosierung zu einer deutlichen Besserung dieser Symptomatik. Allerdings wurde in einem Fall eine Thrombosierung im Bereich der Oxygenatormembran nach knapp 4-stündiger Perfusion beobachtet, die einen Austausch des Schlauchsystems (und Oxygenators) erforderte. Auch Thrombosierungen im Schlauchsystem scheinen trotz Heparinisierung ein häufiges Problem bei Verwendung von Vollblut zu sein, wie Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen zeigen (MAEDA *et al.* 1993; FOWLER *et al.* 1999; GREANEY *et al.* 2010; WORNER *et al.* 2014). GREANEY *et al.* (2010) ersetzten einen Teil des zur Vitalerhaltung eines amputierten Armes verwendeten Vollblutes zunächst durch eine Kombination aus Erythrozytenkonzentraten und Albumin (250 ml Erythrozytenkonzentrat und 50 ml 25% Albumin alle 3–4 Stunden). Als Zielwerte wurden ein Hämatokrit von 20–30% und eine Sauerstoffsättigung von 70–90% festgesetzt. Mit zunehmendem Perfusatverlust aus den Wundflächen des amputierten Armes ersetzten die Autoren einen Teil des Perfusats durch ein Blutersatzpräparat (Normosol-R) und nahmen einen Hämatokritabfall auf 15% im zirkulierenden Perfusat in Kauf. Wie

CONSTANTINESCU *et al.* (2010) und DOMINGO-PECH *et al.* (1991) beobachteten auch wir im Tiermodell, trotz Verwendung von (heparinisiertem) Vollblut-Perfusat in den perfundierten Blutgefäßen selbst keine Gerinnungserscheinungen, was sich auch histologisch bestätigte. Andere Arbeitsgruppen berichten jedoch über Extravasation und intravasaler Gerinnung nach längeren Perfusionszeiträumen (WORNER *et al.* 2014). Der Pathomechanismus hinter diesen Beobachtungen liegt vermutlich in einer Kombination aus einer heparininduzierten erhöhten Gefäßpermeabilität (YOSHIMURA UND DJERASSI 1962), ischämisch oder mechanisch bedingten Endothelschäden und einer mechanischen Komponente durch das Pumpsystem. In Folgeuntersuchungen ließe sich die notwendige Heparindosis durch Verwendung heparinierter Schläuche, wie sie z.B. in der Herzchirurgie Anwendung finden, weiter reduzieren. Eine andere Möglichkeit, die eine Antikoagulation gänzlich überflüssig machen würde, wäre die Verwendung von künstlichen Sauerstoffträgern wie Fluorocarbon (USUI *et al.* 1985) und Fluosol (USUI *et al.* 1985; ROSEN *et al.* 1987; YABE *et al.* 1994).

Hämolyseproblematik

Die zellulären Bestandteile des Blutes können durch Rollerpumpen, pulsatile Pumpen und Membranpumpen beschädigt werden und innerhalb von wenigen Stunden zu einer Hämolyse führen (MAYER UND KAEMPFER 1996). Obwohl in acht von sechzehn aufgeführten Studien erythrozytenhaltige Perfusate eingesetzt wurden (DELORME *et al.* 1964a; DOMINGO-PECH *et al.* 1991; MAEDA *et al.* 1993; CONSTANTINESCU *et al.* 2010; GREANEY *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b; WORNER *et al.* 2014), wurden die Hämolyseeigenschaften des Pumpsystems nur in zwei Fällen thematisiert (MAYER *et al.* 1992b; WORNER *et al.* 2014). WORNER *et al.* (2014) beschreiben ein miniaturisiertes Kleinvolumen-Perfusionssystem für die Perfusion von Kaninchen-Organen. Nach Aussagen der Autoren „scheint [die verbaute pulsatile Pumpe] weniger mechanische Erythrozytenschäden als eine konventionelle Pumpe zu verursachen“. Allerdings bleibt unklar, auf welchen Fakten die Autoren diese Aussage basieren, da Untersuchungen zur Hämolyse gänzlich fehlen. MAYER *et al.* (1993) beobachteten bei der Verwendung von Vollblut in Vorversuchen zur warmen Vitalerhaltung von Geweben einen photometrisch gemessenen Anstieg des freien Hämoglobins von 141 mg/dl auf 408 mg/dl (Median), innerhalb von viereinhalb Stunden, als Indiz für eine progrediente Hämolyse. Die Autoren empfehlen daher Vollblut nur dann als Perfusat einzusetzen, wenn die Perfusion nicht länger als 4–5 Stunden geplant ist. Analog zu MAYER *et al.* (1992b) beobachteten wir während der *in vitro* Voruntersuchungen mit murinem und humanem Vollblut eine fortschreitende Hämolyse des zirkulierenden Blutes, die nach 4–5 Stunden ein statistisch signifikantes Niveau erreichte. Das Haptoglobin, ein anerkannter Hämolyseparameter der für das Ausmaß und die Schwere intravasaler Hämolysevorgänge herangezogen wird (MARCHAND *et al.* 1980; SHIH *et al.* 2014), lag nach sieben Stunden Perfusion erstmals knapp

außerhalb des Referenzbereichs und sank in der Folge weiter ab. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), die ebenfalls zur Diagnostik von Hämolysevorgängen herangezogen wird (SUEDKAMP *et al.* 2004; KATO *et al.* 2006), blieb bei der Perfusion von humanem Blut über drei Stunden konstant und zeigte dann eine signifikante Zunahme. Bemerkenswerterweise lagen die LDH-Werte im menschlichen Blut (im Mittel) bereits nach Abnahme außerhalb des Normbereichs. Die LDH ist nicht spezifisch für Hämolysevorgänge und ist auch bei anderen Erkrankungen, die mit einem erhöhtem Zellzerfall einhergehen sowie nach sportlicher Verausgabung, erhöht (JANAKIRAMAN *et al.* 2011). Die erhöhten Ausgangswerte lassen sich deshalb durch einen (subklinischen) Infekt eines oder mehrerer Probanden oder durch starke körperliche Beanspruchung (mehrere Probanden sind aktive Marathonläufer) erklären. Ein Abnahmefehler ist unwahrscheinlich, da die Kaliumwerte über den gesamten Zeitraum der Perfusion im Normbereich lagen. Die Untersuchungen von murinem Blut bestätigen diese Untersuchungen, wobei hier die Hämolyse bereits zu einem früheren Zeitpunkt einsetzte. Unsere Ergebnisse stimmen mit Angaben aus der Literatur überein (MAYER *et al.* 1992b; MAYER UND KAEMPFER 1996). Die Konsequenz, die wir aus unseren Ergebnissen und aus den Vorgaben der Literatur zogen, war, dass bei Verwendung von Vollblut nach spätestens vier Stunden ein Perfusatwechsel erfolgen muss, um nachteilige Effekte durch eine zunehmende Hämolyse zu vermeiden. Für eine achtstündige Perfusion bedeutet das einen Perfusatwechsel, was uns vertretbar erschien. Für längere Perfusionsversuche muss allerdings über Alternativen nachgedacht werden.

Begrenzte Verfügbarkeit von Vollblut

In Hinblick auf die limitierte verfügbare Blutmenge in dem von uns verwendeten Kleintiermodell, entschieden wir uns dazu Vollblut in verdünnter Form als Perfusat zu verwenden. Eine Hämodilution führt nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz über eine Reduktion der Viskosität und damit einer Erhöhung des Blutflusses zu verbesserten rheologischen Eigenschaften:

$$\text{Blutfluss: } \dot{Q} = \Delta P \cdot \frac{\pi}{8} \cdot \frac{1}{r^4} \cdot \frac{r^4}{l}$$

Gesetz nach Hagen-Poiseuille: R = Gefäßwiderstand, η = Viskosität, ΔP = Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Gefäßes, l = Länge des Gefäßes, r = Gefäßradius. Aus: KLINKE UND SILBERNAGEL (1996)

Wie wir aus den Vorversuchen lernten, führt die Hämodilution mit kristalloiden Lösungen über eine Verschiebung der Starling-Kräfte (KLINKE UND SILBERNAGEL 1996) jedoch auch rasch zu einer ausgeprägten Ödembildung. Auch wenn dies keinen Einfluss auf den Erhalt der Vitalität des Lappens haben muss (BALLANTYNE *et al.* 1980), führte dieser Effekt, gerade in Kombination mit der Vollheparinisierung, zu einem raschen Perfusatverlust in den Lappen und aus dem Lappen. Dadurch ging der eigentliche Sinn der Verdünnung verloren. Auch führte der hohe Blutverlust faktisch zu einem völligen Erliegen des venösen Rückstroms

nach etwa einer Stunde. Für die *in vivo* Versuche wurde die Perfusatzusammensetzung daher dahingehend geändert, dass der Anteil an kristalloider Lösung und die Heparindosis reduziert wurden und ergänzend ein Plasmaexpander (HES) zugesetzt wurde, um das Perfusat im Gefäßsystem zu halten. Dadurch konnte der Perfusatsverlust und die Ödembildung deutlich reduziert und der venöse Rückstrom über den gesamten Zeitraum der Perfusion aufrechterhalten werden. Unsere Beobachtungen decken sich mit denen anderer Autoren, die nach Verwendung reiner Elektrolytlösungen eine ausgeprägte Gewichtszunahme und Ödembildung in den perfundierten Lappen beobachteten (LI *et al.* 1993; MAEDA *et al.* 1993; FOWLER *et al.* 1999; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014). Die Verwendung eines HES-haltigen Perfusats hingegen führt im Vergleich zu kristalloiden Perfusaten zu einer signifikant niedrigeren Gewichtszunahme extrakorporal perfundierten Gewebes (29% vs. 50%) (USUI *et al.* 1985).

Aufgrund der mit der Verwendung von Vollblut verbundenen Schwierigkeiten verwendeten viele Autoren als Blutersatz kristalloide Elektrolytlösungen wie Ringer-Laktat (MAEDA *et al.* 1993) oder Jonosteril® (DRAGU *et al.* 2010; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014), spezielle Nährmedien wie HAMs Keratinozytenkonzentrat (KAISER *et al.* 1993; MAYER *et al.* 1993; MAYER UND KAEMPFER 1996) und MCDB-153 (MAYER *et al.* 1992b) oder kardioplegische Lösungen wie University of Wisconsin Lösung (GORDON *et al.* 1992), Hannover'sche Lösung (HEROLD *et al.* 2009), Eurocollin's Lösung (HEROLD *et al.* 2009) oder HTK-Lösung (TAEGER *et al.* 2014). Reine elektrolytbasierte Auswaschlösungen sind zur Perfusion lokaler Lappen während Ischämie wenig geeignet und führen in manchen Fällen sogar zu einem schädlichen Einfluss auf das Transplantat (z.i. FOWLER *et al.* 1999). Ebenso kann eine zu starke Hämodilution mit Elektrolytlösungen zum Transplantatverlust führen (NAMDAR *et al.* 2010). Experimentelle Blutersatzflüssigkeiten, wie Perfluorotributylamin (FC-43) mit einer dreifach erhöhten Sauerstofftransportfähigkeit als Blut, erwiesen sich als ungeeignete Transportmedien zur Perfusion freier Lappen (MAYER *et al.* 1993). MAYER *et al.* (1993) beobachteten Endothelschäden und Hyalinisierung von Muskelgewebe nach zehnstündiger extrakorporaler Perfusion. Wie WÖRNER *et al.* (2014) anmerken, sollte jedes neue Perfusionsmedium zuerst mit Vollblut verglichen werden. Ringer-Laktat ist im Vergleich zu Vollblut und Blutplasma als Perfusat ungeeignet (MAEDA *et al.* 1993). Der Vergleich zwischen Jonosteril® und Vollblut (DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b) weist gravierende methodische Fehler auf (fehlende Oxygenation, verminderte Sauerstoffabgabe durch künstliche Hypothermie, zu kurze Perfusionsdauer) und lässt daher keine validen Aussagen zu. Ein direkter Vergleich zwischen Vollblut und modernen Blutersatzlösungen wie HAMs, EC, HTK und UW während extrakorporaler Gewebepfusion wurde bisher noch gar nicht durchgeführt. Ver-

gleichende Untersuchungen zu verschiedenen Perfusaten müssen daher Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.3.1.2 Perfusionsdrücke und Blutfluss

Ein weiterer Faktor, der in die Konstruktion und Justierung des Perfusionssystems einfluss, war die Vorgabe eines möglichst physiologischen Blutflusses und Blutdrucks. Aus den Flussmessungen an epigastrischen und femoralen Gefäßen im Rattenmodell war uns bekannt, dass das physiologische Blutflussvolumen durch die von uns kanülierte A. femoralis zwischen 0,3 und 2,4 ml/min liegt. Da durch die Freipräparation der Gefäße Gefäßspasmen auftreten können, die den Blutfluss reduzieren, gingen wir davon aus, dass die höchsten gemessenen Werte am ehesten den physiologischen Werten entsprechen. Wir wählten daher als Volumenvorgabe 2,2 ml/min, um einen hochnormalen Blutfluss zu erzielen. Analog zu unserer Vorgabe verwenden HEROLD *et al.* (2009) 2 ml/min für die Perfusion epigastrischer Lappen im Rattenmodell, wobei abweichend von unserer Studie reine Fettlappen perfundiert wurden. Von anderen Autoren wurden in der Regel ebenfalls hochnormale Flussvorgaben gewählt. Die Angaben aus der Literatur variieren zwischen 2 und 150 ml, abhängig vom verwendeten Tiermodell (HEROLD *et al.* 2009; CONSTANTINESCU *et al.* 2010).

Eine Druckvorgabe war mit unserem System nur indirekt möglich (siehe Seite 38). Als Druckobergrenze wurden hochnormale Werte vorgegeben (130 mmHg), um eine Druckschädigung des Gefäßsystems zu vermeiden. Die Angaben aus der Literatur weisen mit Vorgaben zwischen 36,8 und 500 mmHg eine große Spanne auf (USUI *et al.* 1985; DOMINGO-PECH *et al.* 1991). In einer Arbeit werden Druckvorgaben von 140 kPa (=1050 mmHg) angegeben; es darf aber davon ausgegangen werden, dass bei dieser Angabe eine falsche Maßeinheit verwendet wurde (DRAGU *et al.* 2012b), zumal in einer thematisch vergleichbaren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Bereiche zwischen 51 und 110 mmHg angegeben wurden (DRAGU *et al.* 2010). CONSTANTINESCU *et al.* (2010) berichteten über anfängliche enttäuschende Ergebnisse mit normotonen Drücken und reduzierten daraufhin den Perfusionsdruck auf die Hälfte der *in vivo* gemessenen physiologischen Drücke, um eine Druckschädigung des mikrovaskulären Systems mit konsekutiver Extravasation, Ödembildung und Erhöhung der Kompartimentdrücke zu vermeiden. Aufgrund des geringen Gefäßkalibers der epigastrischen Gefäße erfolgte in unserer Studie die Kanülierung und Perfusion über die femoralen Gefäße. Letztere wurden nach Kanülierung distal des Abgangs der epigastrischen Gefäße unterbunden, um eine ausschließliche Perfusion des Lappens zu erreichen (Abb. 2.9). Damit liegen die von uns für die A. femoralis gemessenen und als Perfusionsvorgaben gewählten Flussvolumina (2,2 ml/min) allerdings über denen, der durch die Ligatur der distalen Femoralisgefäße nun ausschließlich perfundierten A. epigastrica (0,1–0,7 ml/min). Während andere Autoren (BALLANTYNE *et al.* 1980) in *in vivo* Perfusionsversuchen nach Ligatur der

femorale Gefäße distal des Abgangs der epigastrischen Gefäße, ein Absterben der Lappen beobachteten, schien dies in unserem Versuchsaufbau keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Lappen zu haben.

Die in unserem System verbaute Rollerpumpe erzeugte einen annähernd laminaren Blutfluss. Die Frage, ob ein pulsatile Blutfluss für den Erhalt von Organen und Geweben einen Vorteil bringt, ist in der Literatur umstritten (ALGHAMDI UND LATTER 2006; LIKOSKY 2009). Ein pulsatile Blutfluss wurde für die extrakorporale Gewebepfusion nur in zwei Studien eingesetzt (GORDON *et al.* 1992; WORNER *et al.* 2014). Vergleichende Untersuchungen während extrakorporaler Pfusion von Gewebelappen fehlen bisher.

4.3.1.3 Temperatur

Unser System war nicht mit einer Temperaturregulation ausgestattet, und wenngleich autogenes Vollblut körperwarm entnommen wurde, kühlte dies während der Zirkulation durch das Schlauchsystem rasch auf Zimmertemperatur (21°C) ab. Die Temperatur des Perfusats hat direkten Einfluss auf die Temperatur des Lappens. Durch Veränderung der Temperatur des Perfusats lässt sich eine normotherme, mild hypotherme oder hypotherme Pfusion erzielen. Eine Kühlung führt zur Senkung des Sauerstoffverbrauchs und des Energieumsatzes lebender Gewebe und ist eine gebräuchliche Maßnahme für die Vitalerhaltung von Organen und Geweben (CONSTANTINESCU *et al.* 2010; GREANEY *et al.* 2010). Dieses Argument war für uns der ausschlaggebende Grund gewesen, auf eine Temperaturregulation zu verzichten und das Perfusat auf hypotherme Bereiche (Zimmertemperatur) abkühlen zu lassen.

Bei Verwendung von Vollblut als Perfusatgrundlage muss jedoch einem wichtigen physikalischen Phänomen Beachtung geschenkt werden: der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. So führt eine Temperaturabnahme zu einer Affinitätszunahme des Hämoglobins für Sauerstoff (Abb. 4.1).

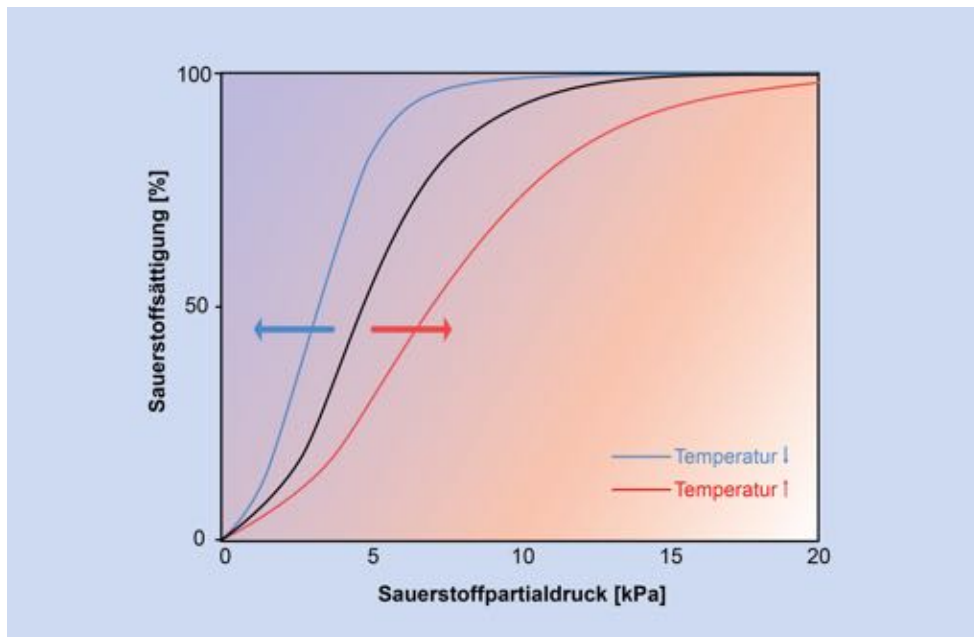


Abb. 4.1: Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoffaffinität. Die schwarze Linie entspricht der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bei 37°C. Eine Temperaturerhöhung des Perfusats führt zu einer Rechtsverschiebung und damit Affinitätsabnahme. Das Senken der Perfusatemperatur hat eine Rechtsverschiebung und damit eine Affinitätszunahme zur Folge. Modifiziert und vereinfacht nach KLINKE UND SILBERNAGEL (1996).

Dies erklärt die hochnormalen Sauerstoffsättigungswerte (und Partialdrücke) im Perfusat während extrakorporaler Perfusion trotz Hämodilution und Verwendung von Raumluft anstatt reinen Sauerstoffs zur Oxygenation. Eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bedeutet jedoch gleichzeitig eine verminderte Sauerstoffabgabe in das Gewebe. Dies könnte unsere Beobachtungen erklären, dass kurz nach Perfusionsbeginn mit raumwarmem Perfusat die gewebs-photospektrometrisch gemessene (oberflächliche) Sauerstoffsättigung im Gewebe, trotz hochnormaler Sättigungswerte im Perfusat und hohen Blutflusseinstellungen (2,2 ml/min), signifikant abfiel. Eine Woche postoperativ erreichten die Sättigungswerte wieder ihr Ausgangsniveau. Erklärungsversuche für diese Beobachtungen finden sich in Kapitel 4.4 „Eigene Ergebnisse und Vergleiche mit der Literatur“ ab Seite 122. Mit einer Ausnahme (WORNER *et al.* 2014) fand die Perfusion in Studien, bei denen Vollblut als Perfusat eingesetzt wurde, bei Zimmertemperatur (COOLEY *et al.* 1990; LI *et al.* 1993; MAEDA *et al.* 1993; LI *et al.* 1995; FOWLER *et al.* 1999; DRAGU *et al.* 2012a; DRAGU *et al.* 2012b) oder zumindest milder Hypothermie (32°C, CONSTANTINESCU *et al.* 2010; MULLER *et al.* 2013) statt. Das Problem der verminderten Sauerstoffabgabe bei Absenken der Gewebetemperatur wurde bisher in keiner Studie thematisiert. Die hohe Einheilrate in unserer Studie lässt vermuten, dass, die durch Kühlung reduzierte Sauerstoffabgabe im Gewebe, durch die gleichzeitige Herabsetzung der Stoffwechselaktivität im Gewebe kompensiert werden konnte. Hier sind jedoch weiterführende Untersuchungen über den Einfluss der Perfusatemperatur während extrakorporaler Perfusion von Geweben notwendig.

4.3.2 VERMEIDUNG MIKROBIELLER BESIEDELUNG

MAYER (2002) sah in einer mikrobiellen Kontamination das größte Problem der extrakorporalen Perfusion freier Lappen. Seine Arbeitsgruppe stellte bei der extrakorporalen Perfusion muskulokutaner und osteomyokutaner Lappen im Schweinmodell nach einer Perfusionsdauer von 72 Stunden ein massives mikrobielles Wachstum fest (MAYER 2002). Die damit verbundene erhöhte Infektionsgefahr war für MAYER der ausschlaggebende Grund, eine Gewebeverpflanzung durch ECP nicht am Menschen durchzuführen. Auch wenn eine bakterielle Besiedelung des Lappens in unserem Versuchsaufbau aufgrund der kurzen Perfusionsdauer vermutlich unerheblich für das Versuchsergebnis gewesen wäre, sollte gerade auch in Hinblick auf folgende Untersuchungen mit dem System das Risiko einer mikrobiellen Besiedelung so klein wie möglich gehalten werden. Dazu musste das System steril und geschlossen sein. Das heißt, alle mit Blut in Kontakt kommenden Oberflächen mussten sterilisierbar, und die einzelnen Schlauchteile und Bauelemente unter sterilen Bedingungen konnektierbar sein. Flüssigkeitsreservoirs und Oxygenatormembran mussten luftdicht abgeschlossen sein. Der Austausch des Perfusats musste technisch einfach, möglichst steril und ohne großen Aufwand möglich sein. Zudem musste das System eine kontinuierliche Kontrolle des Drucks vor dem Lappen, die laborchemische Analyse der Perfusatzusammensetzung und die Beurteilung der optischen Qualität des Perfusats ermöglichen. Abbildung 4.2 zeigt das steril aufgebaute Schlauchsystem, das nun steril befüllt und auf das Perfusionssystem transferiert werden konnte.

Schläuche und Reservoirs waren durchsichtig gestaltet, um eine optische Kontrolle des Perfusats (Sedimentierung korpuskulärer Bestandteile, Hinweise auf Thrombosierungen etc.) zu ermöglichen. Der Perfusatwechsel erfolgte über Dreiwegehähne oder – in einem Fall aufgrund einer Thrombosierung im Bereich der Oxygenatormembran – durch Wechsel des gesamten Schlauchsystems. Beide Methoden des Perfusatwechsels waren für unseren Versuchsaufbau akzeptabel, bedürfen aber in Hinblick auf eine Langzeitanwendung einer Optimierung. Der Austausch über Mehrwegehähne erlaubte in unserem Versuchsaufbau keinen vollständigen Wechsel des Perfusats. Es musste immer ein Mindestrestfüllstand im Schlauchsystem zurückbleiben, um Luftblasen im arteriellen Schenkel zu vermeiden, durch die gefährliche Luftembolien ausgelöst werden könnten. Keime oder hämolysierte Zellen hätten auf diese Weise also nie vollständig aus dem System entfernt werden können, und könnten zur Verlegung von Gefäßen durch Zellbestandteile oder Keime oder zur mikrobiellen Besiedelung des Lappens führen. Der Austausch des gesamten Schlauchsystems hingegen ist wesentlich aufwändiger und erfordert zumindest die Diskonnektierung im Bereich der Arteriotomiekanüle, was wiederum das Risiko einer mikrobiellen Besiedelung erhöhen würde.

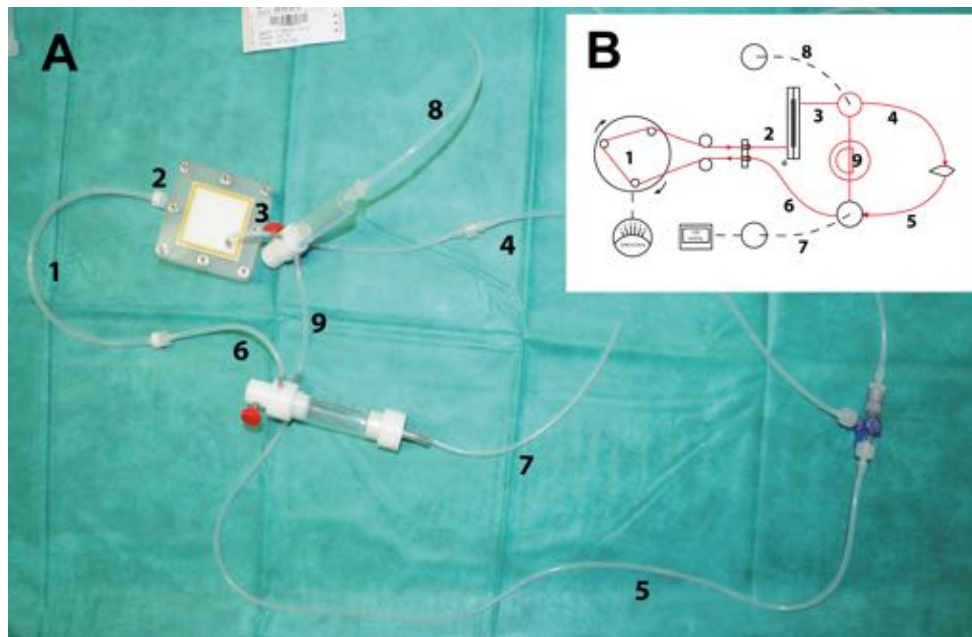


Abb. 4.2: Steril montierbares Schlauchsystem. (A) Unter sterilen Bedingungen aufgebautes Schlauchsystem, das nach Bestücken der Schläuche 7 und 8 mit Luffiltern steril auf die Pumpe aufgebracht werden kann. Auf diese Weise bleiben alle mit Blut in Kontakt kommenden Oberflächen steril. An die Stelle des Dreiwegehahns wird nach Durchspülen des Systems mit Heparinlösung das zu perfundierende Gewebe geschaltet. (B) Schematischer Aufbau des Perfusionssystems.

4.3.3 KONTINUIERLICHE DOKUMENTATION

Unser heutiges Wissen über die physiologischen und biochemischen Vorgänge in freien Lappen während extrakorporaler Perfusion ist sehr beschränkt. Ein Ziel unserer Studie war es daher, mehr über diese Abläufe während der Vitalerhaltung epigastrischer Lappen in der Ratte zu erfahren. Über ein Barometer wurde der Druck im Schlauchsystem vor dem Lappen kontinuierlich abgegriffen. Dieser Druck entsprach allerdings nicht 1:1 den Druckverhältnissen im Lappen. Die Platzierung einer Einschwemmsonde war aufgrund unseres Versuchsaufbaus nicht möglich gewesen. Da auf die Perfusatzusammensetzung während der achtstündigen Perfusion kein äußerer Einfluss von Seiten der Untersucher erfolgte, gaben Änderungen der Perfusatzusammensetzung indirekte Hinweise auf die Stoffwechsellistung innerhalb des Lappens. Über Dreiwegehähne wurden in engmaschigen Abständen Proben aus dem venösen Reservoir entnommen. Analog zu *MAYER et al. (1992b)* wurde zudem die Sauerstoffdifferenz zwischen arteriellem und venösem Reservoir bestimmt, um weitere Rückschlüsse auf die Stoffwechsellistung innerhalb des Lappens zu erhalten.

4.3.4 MOBILES DESIGN UND EINFACHE BEDIENUNG

Weniger in Hinblick auf die vorliegende Studie, als vielmehr als „proof of concept“ für kommende Projekte mit zukünftigen Pumpengenerationen, und eine mögliche klinische Anwendung in der Zukunft, sollte das System möglichst klein, kostengünstig, transportabel und we-

nig fehleranfällig gestaltet sein und sich innerhalb weniger Minuten steril aufbauen lassen, um es z.B. in klinischen Notfallsituationen einsetzen zu können.

4.4 EIGENE ERGEBNISSE UND VERGLEICHE MIT DER LITERATUR

Unsere Arbeit beschreibt erstmals systematisch, umfassend, und im Vergleich mit entsprechenden Kontrollgruppen die erfolgreiche Replantation mikrovaskulärer Lappen im Kleintiermodell nach Perfusion über einen vollständig abgekoppelten geschlossenen Kreislauf über einen Zeitraum, der deutlich über der Ischämietoleranzgrenze zusammengesetzter Gewebe liegt.

4.4.1 ETABLIERUNG DES MODELLS

Für den Erfolg einer Replantation ist eine möglichst rasche Reoxygenierung entscheidend. Nicht-perfundierte epigastrische Lappen wurden nach einem Ischämieintervall von acht Stunden, innerhalb von drei Tagen, in allen Fällen nekrotisch (negative Kontrolle). Dadurch ist bewiesen, dass der von uns gewählte Ischämiezeitraum lang genug gewählt war, um ein Einheilen der Lappen ohne entsprechende Maßnahmen unmöglich zu machen. Lappen hingegen, die unmittelbar nach vollständiger Hebung replantiert wurden (Sham Operation, positive Kontrolle) waren nach sieben Tagen nahezu vollständig vital (96%). Dadurch wurde zum einen bestätigt, dass das Lappenmodell, wie in der Literatur beschrieben (STRAUCH UND MURRAY 1967), funktioniert. Zum anderen konnten wir damit bestätigen, dass die von uns gewählten Lappendimensionen (4 x 7 cm) und die Positionierung der Hautinsel so gewählt waren, dass eine ausreichende Perfusion über den Gefäßstiel und ein Einheilen innerhalb von sieben Tagen möglich war. Teilnekrosen traten in dieser Gruppe ausschließlich im Bereich der „letzten Wiese“, also im kranialsten Anteil des Lappens, auf. Wie im Folgenden ausführlich erörtert wird, war es mit diesem Modell möglich, Lappen über einen Zeitraum, der deutlich über der Ischämietoleranzgrenze lag, vital zu erhalten und nach anschließender Replantation in einem hohen Prozentsatz zur Einheilung zu bringen. Als direkter Vergleich dienten *in vivo* perfundierte Lappen bei ansonsten identischem Versuchsaufbau. Steriler Aufbau, Befüllen des Systems und Kanülierung der femoralen Gefäße war innerhalb weniger Minuten problemlos möglich, wodurch sich auch die Ischämiezeit, also der Zeitraum vom Absetzen der Gefäße bis zum Starten der Pumpe, auf wenige Minuten beschränkte. Der Aufrechterhalt der Perfusion mit unserem System gelang ebenfalls mit zwei Ausnahmen, bei denen ein Perfusatwechsel bereits nach 3 ½ bzw. 3 ¾ Stunden (statt nach vier Stunden) notwendig wurde, problemlos. Ausgenommen von den aufgrund von Hämolysevorgängen und fehlender Dialysoption notwendigen vollständigen Perfusatwechseln, wurde kein Einfluss auf das Perfusat genommen, sodass die aus dem Perfusat erhobenen Werte repräsentativ für die Vorgänge im Lappen sind.

4.4.2 BEOBACHTUNGEN ZU BEGINN DER PERFUSION

4.4.2.1 Klinische Beobachtungen

Nach Start der Perfusion zeigte sich unmittelbar wieder ein eindrückliches Rekapillarisationsphänomen, das durch temporäre Erhöhung des Blutflussvolumens noch gesteigert werden konnte. Der venöse Rückstrom setzte wenige Minuten zeitversetzt ein und zeigte bereits makroskopisch durch die dunklere Farbe eindrücklich den niedrigeren Oxygenierungsgrad im Vergleich zum arteriellen Schenkel.

4.4.2.2 Indocyanin-Grün Videoangiographie

Die ICG-Angiographie ist ein anerkanntes Verfahren zur Beurteilung von Mikroanastomosen und zur Perfusionsdiagnostik freier Gewebetransplantate (GIUNTA *et al.* 2005; HOLM *et al.* 2010; MÜCKE *et al.* 2010a). Mit Hilfe der ICG-Angiographie sind bereits intraoperativ Aussagen über die Erfolgswahrscheinlichkeit eines Gewebetransplantats möglich (GIUNTA *et al.* 2005). In unserer Arbeit bestätigte die ICG-Angiographie unsere klinischen Beobachtungen. In allen untersuchten extrakorporalen Lappen kam es innerhalb von 1–3 Minuten zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals, und der versorgende Gefäßbaum ließ sich durch die Haut visualisieren. Auch der venöse Rückstrom konnte mit dieser Methode dargestellt werden. In einzelnen Fällen nahmen Bereiche im oberen Drittel des Lappens kein Fluoreszenzsignal auf und zeigten auch in diesen Regionen keine typische fluoreszierende Gefäßzeichnung. Diese Teilbereiche des Lappens wurden im Zeitraum von sieben Tagen ausnahmslos nekrotisch (Abb. 3.4F). Im Vergleich zu ICG-Messungen vor Hebung des Lappens war die Zeit bis zum Erreichen der maximalen ICG-Intensität während extrakorporaler Perfusion allerdings verzögert (15–20 Sekunden vs. 60–180 Sekunden). Diese verzögerte Anflutung beobachteten wir allerdings auch in anderen Versuchsgruppen nach Lappenhebung, sodass die Ursache hierfür, auch in der geänderten Vaskularisierung des Lappens nach Durchtrennung aller Perforatoren und horizontal einstrahlender Hautgefäße nach Umschneidung der Hautinsel, oder durch Gefäßspasmen der epigastrischen/ femoralen Gefäße begründet sein kann. Nach sieben Tagen zeigte sich eine regelrechte Gefäßarchitektur, die den präinterventionellen Angiographien entsprach. Unsere Beobachtungen sind mit angiographischen Untersuchungen venöser Lappen während extrakorporaler Perfusion vergleichbar (MAEDA *et al.* 1993). Aufgrund technischer Probleme war eine quantitative Analyse und statistische Auswertung der ICG-Daten nicht möglich (Erklärung siehe Ergebnisteil ab Seite 89).

4.4.3 VORGÄNGE WÄHREND EXTRAKORPORALER PERFUSION

4.4.3.1 Klinische Beobachtungen

Erwähnenswert ist die klinische Beobachtung, dass nach mehrstündiger extrakorporaler Perfusion alle Lappen in unterschiedlicher Ausprägung disseminierte, petechiale Einblutungen

entwickelten. Diese Beobachtungen fanden sich in keiner anderen Studiengruppe. Die Einblutungen traten über den ganzen Lappen verteilt, gehäuft jedoch im zentralen und kranialen kranialen Drittel („letzte Wiese“) auf (Abb. 3.3). Einzelne disseminierte Läsionen schienen keinen Einfluss auf die Vitalität des Lappens zu haben, während dunkel-livide Bereiche aus konfluierenden Einblutungen in der Regel zur Teilnekrose des Lappens nach sieben Tagen führten. Ähnliche Beobachtungen werden in der Literatur während extrakorporaler Perfusion bisher nicht beschrieben.

4.4.3.2 Gewebe-Photospektrometrie

Die Gewebe-Photospektrometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der Vitalität freier Gewebelappen (LOEFFELBEIN 2003; HÖLZLE *et al.* 2006; HÖLZLE *et al.* 2010). Der Hämoglobingehalt ist ein anerkannter Vorhersagewert für Lappennekrosen (SERAFIN *et al.* 1977; SIMPSON *et al.* 1996; WOLFF *et al.* 1998; CLARK *et al.* 2007; TAMAS *et al.* 2010). Bereits intraoperativ lassen sich Vorhersagen über die Entstehung von Lappennekrosen machen. So gelten prä- und postoperative Messungen von Hb, Flow und Velocity als prädikative Faktoren für die Entstehung einer Lappennekrose (MÜCKE *et al.* 2011). Nach Stielabsetzung hingegen sind SO_2 und Flow für die Vorhersage von Nekrosen relevant (MÜCKE *et al.* 2011). Dabei korrelieren weniger die absoluten Werte als vielmehr die Änderungen der Werte im zeitlichen Verlauf mit der Entstehung von Nekrosen (MÜCKE *et al.* 2011). Die in unserer Studie erhobenen gewebe-photospektrometrischen Messungen decken sich mit den qualitativen ICG-angiographischen Beobachtungen. Hier zeigt sich, trotz hochnormaler Volumenvorgaben, tendenziell ein Rückgang der gewebe-photospektrometrisch gemessenen Blutflussvolumina (Flow) und Blutfließgeschwindigkeiten (Velocity) zu Beginn der Perfusion im Vergleich zu den präoperativen Werten. Dieser Rückgang war jedoch nicht statistisch signifikant. Die (tiefen) Hämoglobinwerte lagen hingegen zu Beginn der extrakorporalen Perfusion statistisch signifikant über den Ausgangswerten, was für eine initiale venöse Stauung im Lappen spricht. Tatsächlich entwickelte sich der venöse Rückstrom mit Beginn der extrakorporalen Perfusion zeitverzögert. Mit fortschreitender Perfusion etablierte sich jedoch ein konstanter venöser Rückstrom, wodurch die Hämoglobinwerte nach zwei Stunden wieder ihr Ausgangsniveau erreichten. Da auch nach Beginn der *in vivo* Perfusion ein statistisch signifikant erhöhter Hämoglobingehalt gemessen wurde, lässt sich der initial zögerliche venöse Rückfluss auch durch eine geänderte vaskuläre Anatomie nach Lappenhebung oder einen Gefäßspasmus der venösen Gefäße durch Manipulation im Rahmen der Lappenhebung bzw. Freipräparation der Gefäße erklären. Dafür spricht auch die im Rahmen der Vorversuchen ermittelte signifikante Reduktion des Blutflusses durch die V. femoralis nach Lappenhebung, was für die Spasmus-Anfälligkeit des Gefäßes auf Manipulation spricht.

Blutließgeschwindigkeit, Blutflussvolumen und Hämoglobingehalt blieben nach anfänglichem Abfall (Flow, Velocity) bzw. Anstieg (Hb) über einen Zeitraum von sechs Stunden konstant. Nach sechs Stunden kam es zu einem vorübergehenden Einbruch von Flow und Velocity und einem zunehmenden oberflächlichen Hb-Anstieg. Diese Beobachtungen korrelieren zeitlich mit dem Auftreten oben beschriebener petechialer Einblutungen. Im weiteren Verlauf normalisierten sich die Werte wieder. Die Veränderung der gewebe-photospektrometrischen Parameter zeigten während achtstündiger *in vivo* Perfusion einen sehr ähnlichen Verlauf (Abb. 3.10 bis 3.13). Auch hier kam es initial zu einem Absinken von Blutflussvolumen und -fließgeschwindigkeit und einem Anstieg der Hämoglobinmenge. Die gemessenen Blutflussvolumina waren geringer als während extrakorporaler Perfusion, erreichten jedoch nach acht Stunden auch in dieser Gruppe wieder das Ausgangsniveau. Statistische Vergleiche zwischen den Gruppen wurden aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen dieser Methode (LOEFFELBEIN 2003; HÖLZLE *et al.* 2006) nicht durchgeführt. Auch der Hämoglobingehalt stieg mit Beginn des Perfusionsintervalls analog zur ECP-Gruppe signifikant an, normalisierte sich jedoch im Gegensatz zu extrakorporal perfundierten Lappen deutlich später (nach 6 Stunden). Vergleichsdaten finden sich in der Literatur nicht.

Während die tiefe Sauerstoffsättigung während der gesamten Perfusionsdauer konstant blieb, sank die oberflächliche Sättigung nach Lappenhebung und Stieldruchtrennung sowohl in der ECP-Gruppe als auch in der *in vivo* perfundierten Gruppe signifikant ab und blieb während der Perfusion bei Werten um 20% konstant. Da analoge Beobachtungen auch in den anderen Kontrollgruppen gemacht wurden, lässt sich der Sauerstoffabfall möglicherweise durch die geänderte vaskuläre Anatomie des, nach Durchtrennung aller Perforatoren des tiefen epigastrischen Systems und aller lateral einstrahlenden Hautgefäße, ausschließlich auf dem superfiziellen epigastrischen Stiel basierenden, Lappens erklären. Auch ein Gefäßspasmus durch die Manipulation der epigastrischen und femoralen Gefäße im Rahmen deren Freipräparation wäre denkbar. Ein drittes Erklärungsmodell für die niedrigen oberflächlich gemessenen Sauerstoffwerte im Vergleich zu den konstant hohen tiefen Messwerten, ist die herabgesetzte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Abb. 4.1). Die körpernahen, wärmeren Bereiche des Lappens führten über eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve zu einer erhöhten Sauerstoffabgabe aus dem Perfusat in das Gewebe. In den oberflächlichen, der Raumluft exponierten Lappenanteilen hingegen, blieb die Sauerstoffaffinität kältebedingt hoch, wodurch die Abgabe ins Gewebe reduziert wurde. Da dieser Effekt auch der geringeren Sauerstoffaffinität in oberflächlichen Lappenbereichen auch *in vivo*, also vor Lappenhebung auftreten müsste, hier jedoch signifikant höhere oberflächliche Sauerstoffsättigungen gemessen wurden, halten wir eine Kombination der drei oberen Erklärungsmodelle für am Wahrscheinlichsten. Durch die geänderte Lappenanatomie mit nun rein axialem und damit

entsprechend langsameren Versorgungsmuster in Kombination mit einem Spasmus des einzigen versorgenden Gefäßes (A. epigastrica), verlangsamte sich der Blutfluss in beiden Gruppen (K3 und ECP) gleichermaßen. Durch die geänderte Anatomie und den veränderten Blutfluss im Lappen kühlte dieser stärker aus, wodurch der Effekt der erniedrigten Sauerstoffaffinität stärker wurde. Nach erfolgter Revaskularisierung nach sieben Tagen entsprach die oberflächliche Sauerstoffsättigung, außer in nicht perfundierten Lappen (K2), wieder den Ausgangswerten. DRAGU *et al.* (2012b) verwendeten „dynamic quenching models“, die nach dem Prinzip der Fluoreszenzlöschung Sauerstoffmessungen im Gewebe während extrakorporaler Perfusion von Rectus-abdominis-Lappen im Schwein ermöglichten. Die Autoren stellten sowohl bei Verwendung kristalloider Lösung, als auch bei Verwendung von Vollblut – analog zu unseren O2C-Messungen – einen Sättigungsabfall mit Beginn der Perfusion fest. Da keine Oxygenation verwendet wurde, stagnierten die Sauerstoffwerte jedoch im kaum noch messbaren Bereich (0–2%), was die Notwendigkeit einer Oxygenierung erneut unterstreicht (DRAGU *et al.* 2012b).

4.4.3.3 Blutgasanalyse und Laborchemie

Die Blutgasanalyse lieferte weitere Erkenntnisse über die biochemischen und physiologischen Abläufe während der extrakorporalen Perfusion epigastrischer Lappen. Trotz Hämodilution blieben Sauerstoffsättigung und Sauerstoffpartialdruck während der gesamten Perfusionsdauer auf hochnormalem Niveau konstant. Dies führen wir auf die hohe Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bei Zimmertemperatur zurück (Abb. 4.1).

Die Qualität der Perfusion zeigt sich auch in einem hohen pH-Wert, der, entgegen anderen Untersuchungen (USUI *et al.* 1985; DOMINGO-PECH *et al.* 1991; MULLER *et al.* 2013), über viele Stunden ohne die Verwendung von Natriumbikarbonat konstant gehalten werden konnte. CONSTANTINESCU *et al.* (2010) beobachteten ebenfalls konstante pH-Werte bei der ECP von Schweinegliedmaßen über einen zwölfstündigen Zeitraum. Es ließe sich erwarten, dass das Abkühlen des Perfusats von Körpertemperatur auf Zimmertemperatur zu einem temperaturbedingten pH-Anstieg führen würde (GORDON *et al.* 1992). Ein entsprechender pH-Anstieg wurde im Rahmen der Vorversuche auch tatsächlich beobachtet. Bei der extrakorporalen Perfusion epigastrischer Lappen hingegen ließ sich kein pH-Anstieg messen. Der pH-Wert sank im Gegenteil während der extrakorporalen Perfusion kontinuierlich ab, blieb jedoch über einen Zeitraum von vier Stunden im Normbereich. Nur bei einem Tier wurde ein frühzeitiger Perfusatwechsel nach 3 Stunden und 45 Minuten durchgeführt, da der pH-Wert unter 7,300 gefallen war. Analog zu den Beobachtungen von GORDON *et al.* (1992) kann davon ausgegangen werden, dass ischämische Vorgänge im Lappen oder hämolytische Prozesse im Blut einem kühlungsbedingten pH-Anstieg entgegenwirkten.

Kohlendioxidpartialdruck, Bicarbonat und Base Excess sanken während diesem Zeitraum kontinuierlich und statistisch signifikant ab. Diese nach vier Stunden beobachtete Konstellation aus reduziertem $p\text{CO}_2$, Bicarbonat und Basenüberschuss bei normwertigem pH-Wert wird als respiratorisch kompensierte metabolische Azidose bezeichnet. Ein solches Säure-Base-Ungleichgewicht findet sich in erster Linie bei Laktatazidosen und tritt z.B. im Rahmen eines kardiogenen oder septischen Schocks, schwerer Gewebetraumen oder bei Minderperfusion (Ischämie) und Hypoxie auf (KLINKE UND SILBERNAGEL 1996). GRAVANTE *et al.* (2010) beobachteten in einem durch isovolämische Hämodilution erzeugten Ischämiemodell zur normothermen *ex vivo* Leberperfusion einen kontinuierlichen und signifikanten Laktatanstieg während sechsständiger Perfusion. Sie führten diesen Laktatanstieg auf die erzeugte Ischämie zurück. Allerdings verwendete die Arbeitsgruppe eine zu Hämolyse neigende Zentrifugalpumpe; der beobachtete Laktatanstieg ließe sich also auch durch eine intravasale Hämolyse mit Laktatfreisetzung aus hämolysierten Erythrozyten erklären, zumal weiterführende Untersuchungen zur Hämolyse des von GRAVANTE *et al.* verwendeten Systems fehlen. DOMINGO-PECH *et al.* (1991) beschreiben ebenfalls die Entwicklung einer metabolischen Azidose während der extrakorporalen Perfusion von Hundegliedmaßen, der sie durch Beimischung von Natriumbicarbonat entgegenwirkten.

Bei CONSTANTINESCU *et al.* (2010) hingegen blieben pH-Wert, Basenüberschuss und $p\text{CO}_2$ ohne weitere Substitution über einen Zeitraum von zwölf Stunden stabil, während ein zunehmender Kaliumanstieg in der Muskulatur im Verlauf eine Substitution mit Glukose und Insulin erforderte. Der Austausch von Kaliumionen gegen extrazelluläre Wasserstoffionen erklärt den signifikanten Anstieg des gemessenen Kaliumspiegels in unserer Studie nach vier Stunden. Eine Hyperkaliämie ist eine häufige Begleitkomplikation metabolischer Azidosen. Die Kaliumwerte blieben in unserer Studie allerdings, entgegen anderer Untersuchungen (CONSTANTINESCU *et al.* 2010; MULLER *et al.* 2013), ohne zusätzliche Glukose- und Insulingaben im Normbereich. Eine Bestimmung des Laktats war mit dem Laborgerät, das für die Blutanalyse während extrakorporaler Perfusion eingesetzt worden war, nicht möglich. Die Ergebnisse der Vorstudien zeigten jedoch bereits, dass es selbst ohne zwischengeschalteten Lappen zu einem signifikanten Laktatanstieg nach vier Stunden kam. Dieser erfolgte synchron mit dem Anstieg der LDH im Serum und hing vermutlich ebenfalls mit der oben beschriebenen schleichenden Hämolyse zusammen, die durch Rollerpumpe und Oxygenator ausgelöst worden war. Die gewebespektrometrisch im Zentrum des Lappens gemessenen Blutflussvolumina und Blutfließgeschwindigkeiten blieben während der achtstündigen extrakorporalen Perfusion konstant. Gleiches gilt für die tiefen Sauerstoffwerte. In der Zusammenschau dieser Befunde sehen wir die intravasale Hämolyse als wahrscheinlichste Ursache für die beobachtete Disbalance des Säure-Base-Haushalts. Territoriale Minderdurchblu-

tungen in einzelnen Lappenabschnitten lassen sich aber letztendlich nicht sicher ausschließen.

4.4.3.4 Lappengewicht

Kristalloide Lösungen führen durch Extravasation von Flüssigkeit ins Interstitium zu Ödemen und damit zu einer Gewichtszunahme. Manche Autoren vermuten darüber hinaus eine hydrostatische Komponente durch den Pumpvorgang (USUI *et al.* 1985). Die von uns in den Voruntersuchungen, bei Verwendung hochverdünnten Vollbluts, beobachtete massive Ödembildung und Gewichtszunahme wird von anderen Autoren bei Verwendung kristalloider Lösungen oder verdünnten Vollbluts bestätigt (USUI *et al.* 1985; DOMINGO-PECH *et al.* 1991; LI *et al.* 1993; MAEDA *et al.* 1993; FOWLER *et al.* 1999; DRAGU *et al.* 2012b; TAEGER *et al.* 2014). DOMINGO-PECH *et al.* (1991) beobachteten eine Gewichtszunahme von 20 bis 50% nach 24-stündiger extrakorporaler Perfusion mit hochverdünntem (27,5%) Vollblut, der sie durch Prednisolongabe, Gabe eines peripheren Vasodilatators (Nitroglycerin), und Senkung der Perfusatemperatur entgegenzuwirken versuchten. CONSTANTINESCU *et al.* (2010) verwendeten zunächst niedrige physiologische Flussraten und Perfusionsdrücke. Unter Verwendung normotoner Drücke kam es jedoch zu einer Gewichtszunahme und Zunahme der Kompartimentdrücke in den perfundierten Extremitäten. Die Arbeitsgruppe reduzierte daraufhin die Flussrate auf 100–150 ml/min, was einem mittleren systemischen Druck von ca. 38,5 mmHg, und damit ca. 50% der *in vivo* gemessenen Werte entsprach. Dadurch erhofften sich die Autoren eine Druckschädigung des mikrovaskulären Systems vermeiden zu können. Tatsächlich ließ sich durch die Druckreduzierung eine Reduktion der Ödeme und Extravasationen mit einer geringen Gewichtszunahme (1,32%) als Folge einer Druckschädigung des Kapillarbetts verzeichnen (CONSTANTINESCU *et al.* 2010). Wir stellten in unseren Tierversuchen nach Modifikation des Perfusats durch Beimischung von Hydroxyethylstärke bei hochnormalen Perfusionsdrücken eine mittlere Gewichtszunahme von knapp 10% fest, womit wir weit unter den von anderen Autoren berichteten Werten von 20–50% (USUI *et al.* 1985; DOMINGO-PECH *et al.* 1991) lagen. Eine Verminderung der Gewichtszunahme durch HES-Zugabe zum Perfusat während extrakorporaler Perfusion wurde auch von anderen Autoren beobachtet (USUI *et al.* 1985).

4.4.3.5 Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz und venöser Rückfluss

Die Sauerstoffdifferenz zwischen arteriellem und venösem Schenkel wird von einigen Autoren als Marker für einen funktionierenden Stoffwechsel im perfundierten Gewebe verwendet (MAYER *et al.* 1992b; MAYER 2002). Die Autoren bestimmten einen Sauerstoffverbrauch von 0,003 ml O₂/min/g (Median) in extrakorporal perfundierten Schweinevorfüßen (MAYER *et al.* 1992b), der nach 72-stündiger Perfusion noch Werten unmittelbar nach Lappenhebung entsprach. In unserer Studie war der Unterschied zwischen arterialisiertem (hellrot) und des-

oxygeniertem (dunkelblau) Blut bereits mit bloßem Auge deutlich sichtbar (Abb. 2.10B). Die gemessene Sättigungsdifferenz zwischen arteriellem und venösem Schenkel lag zwischen bei 33,7% (arteriell 98,9%, venös 65,2%) und blieb über den Perfusionszeitraum von acht Stunden konstant.

Ischämische Gewebeschädigung, Endothelschäden und interstitielle Ödeme werden für die Beobachtung eines fehlenden Rückflusses im ischämisch geschädigten freien Lappen verantwortlich gemacht, ein Symptom, das auch als „no reflow“ Phänom bekannt ist (CHAIT *et al.* 1978; MAY *et al.* 1978; ROSEN *et al.* 1985; WANG *et al.* 1996). Ein „no reflow“ Phänomen wurde auch bei händischer *ex vivo* Perfusion freier Lappen mit heparinisiertem Vollblut während prolongierter Ischämiephasen beobachtet (COOLEY *et al.* 1990; LI *et al.* 1993). CONSTANTINESCU *et al.* (2010) stellten unter Verwendung eines geschlossenen Perfusionskreislaufs, in dem das venöse Blut durch die Pumpe aus dem venösen System gesaugt wird, eine Schädigung des venösen Systems fest. Die Autoren stellten daher auf ein, wie von DELORME *et al.* (1964a) verwendetes, halb-offenes Perfusionssystem um, bei dem das austretende (venöse) Blut in einem Reservoirbeutel aufgefangen wurde und von dort aus zurück in das Perfusionssystem gesaugt wurde. Diese Anordnung verhindere einen Sogschaden am venösen System und verbessere die visuelle Kontrolle des austretenden Blutes. Dieser Überlegung steht der Nachteil eines erhöhten Blut-Luft-Kontaktes mit entsprechend höherer Infektionsgefahr gegenüber. Analog zu CONSTANTINESCU *et al.* (2010) stellten wir im Rahmen der Pilotversuche mit Verwendung eines geschlossenen Systems mit zusätzlichem venösem Sog eine massive Ödembildung, Hämorrhagien und ein nahezu vollständiges Ausbleiben des venösen Rückflusses („no reflow“) fest. Das später für die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Untersuchungen eingesetzte Perfusionssystem der dritten Generation verfügte weiterhin über die Möglichkeit, fakultativ einen venösen Sog aufzubauen. Diese Funktion wurde jedoch aus oben genannten Gründen deaktiviert. Zudem stand das System über einen Luft- und Bakterienfilter mit der Außenwelt in Kontakt, wodurch ein zu hoher Sog auf das venöse System vermieden werden konnte. Dadurch ließ sich in der *in vivo* Studie ein zwar initial zögerlicher aber konstanter venöser Rückfluss beobachten. Zusammen mit den physiologischen Sauerstoffwerten im Gewebe und der konstant hohen arteriovenösen Sauerstoffdifferenz kann dies als Indiz für einen intakten Stoffwechsel im Gewebe gewertet werden.

4.4.4 ERGEBNISSE NACH SIEBEN TAGEN

4.4.4.1 Klinische Beobachtungen und Nekroserate

Das Hauptkriterium für die Beurteilung der Vitalität war eine erfolgreiche Einheilung nach sieben Tagen. Dies wurde in Form der Nekroserate in Zahlen gefasst. Erwartungsgemäß heilten alle Lappen in der Sham-Gruppe (keine Ischämiezeit) nahezu folgenlos ein (Nekroserate 8%), während sich nach achtstündiger warmer Ischämie (Negativkontrolle) ausnahmslos alle Lappen nach drei Tagen demarkierten und im weiteren Verlauf eine Totalnekrose entwickelten (96%). Extrakorporal perfundierte Lappen heilten in einem hohen Prozentsatz ein. Klinisch evidente Teilnekrosen machten 30% der transplantierten Lappenfläche aus, was sich nicht statistisch signifikant von der Sham-Gruppe (8%, $p=,05$) unterschied. Damit wiesen extrakorporal perfundierte Lappen sogar eine niedrigere Nekroserate auf als Lappen, die über den gleichen Zeitraum über den Gefäßstiel *in vivo* perfundiert worden waren (55%, $p=,083$). Diese (statistisch nicht signifikante) Differenz ist möglicherweise darin zu begründen, dass die feste Volumenvorgabe der Pumpe initiale Gefäßspasmen, die durch die Freipräparation und Manipulation des Lappens entstanden waren, durchbricht. Ein anderer Erklärungsversuch für diese unterschiedlichen Erfolge zwischen *in vivo* und extrakorporaler Perfusion könnte ein systematischer Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen sein. In der Kontrollgruppe waren die Femoralgefäße nicht distal der epigastrischen Gefäßabgänge ligiert worden. Hierdurch verteilte sich das Blutflußvolumen durch die A. femoralis auf epigastrischen Lappen und distal der epigastrischen Gefäße liegende Versorgungsgebiete. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass eine Ligatur der Femoralisgefäße distal der epigastrischen Abgänge zu einem Lappenverlust führen kann (BALLANTYNE *et al.* 1980). In unserer Studie wurden hingegen keine Lappenverluste beobachtet, vielmehr führte die Ligatur der Gefäße, die Vorgabe hoher Flussvolumina und die hohe Sauerstoffsättigung bei gleichzeitiger Absenkung des Stoffwechsels (Kühlung) in der ECP-Gruppe zu einer „Luxusperfusion“. Diese spiegelt sich auch im Vergleich zu *in vivo* perfundierten Lappen in höheren gewebe-photospektrometrisch gemessenen Blutflusswerten wieder. Zumindest bei der Vitalerhaltung über ein relativ kurzes Intervall von acht Stunden schien dies vorteilhaft zu sein. Inwieweit sich die dadurch verursachten Effekte (petechiale Einblutungen etc.) bei längeren Perfusionszeiten potenzieren und wie sich das auf den Vitalerhalt auswirkt, kann mit unserem bisherigen Wissensstand nicht beantwortet werden.

4.4.4.2 Feingewebliche Untersuchungen

Da die Lappen in unserer Studie nach achtstündiger extrakorporaler Perfusion replantiert wurden und einheilen konnten, waren histologische Untersuchungen während bzw. gegen Ende der extrakorporalen Perfusion nicht möglich. In Anbetracht der hohen Einheilrate in unserer Studie ist aber davon auszugehen, dass die in vergleichbaren Studien beobachteten

Schäden auf zellulärer Ebene (YABE *et al.* 1994; DRAGU *et al.* 2012a; TAEGER *et al.* 2014) in unserer Studie entweder weniger gravierend waren oder reversibel sind. In klinisch unauffälligen Abschnitten zeigte sich auch lichtmikroskopisch ein regelrechter feingeweblicher Aufbau. Lichtmikroskopische Hinweise auf eine stattgehabte Hypoxie wie ausgeprägte Zellödeme (HEINZELLER UND BÜSING 2001) fehlten. Zur Diagnostik einer stattgehabten Hypoxie oder Minderperfusion ist die Lichtmikroskopie allerdings auch nur eingeschränkt geeignet. Morphologische Zeichen einer stattgehabten Hypoxie wie Mitochondrienschwellungen, Verklumpung des Chromatins, Karyolyse oder ein Zerfall der Zellmembran (HEINZELLER UND BÜSING 2001) können nur elektronenmikroskopisch beurteilt werden.

4.4.5 ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG DER EIGENEN ERGEBNISSE

Unsere Studie zeigt, dass durch ECP eine Vitalerhaltung über einen Zeitraum von acht Stunden möglich ist und Lappen nach anschließender Replantation in einem hohen Prozentsatz einheilen. Der gewählte Zeitraum liegt damit deutlich über der Ischämietoleranz zusammengesetzter Lappen (maximal sechs Stunden). Acht Kontrolllappen entwickelten nach achtstündiger Ischämie und anschließender Replantation ausnahmslos Totalnekrosen, während sofortreplantierte Lappen nahezu vollständig einheilten. Damit beschreibt unsere Studie erstmals systematisch, umfassend und im Vergleich mit Kontrollgruppen die erfolgreiche Replantation mikrovaskulärer Lappen nach mehrstündiger extrakorporaler Perfusion über ein vollständig vom Körperkreislauf abgekoppeltes Kreislaufsystem im Kleintiermodell. Während extrakorporaler Perfusion entwickelte sich innerhalb von vier Stunden eine kompensierte metabolischen Azidose. In der Zusammenschau der Befunde ist dieses Säure-Basen-Ungleichgewicht am ehesten auf eine im Rahmen von Hämolysevorgängen entstandene Laktatazidose zurückzuführen. Durch die Regulationsmöglichkeiten des Perfusionssystems ließ sich in extrakorporalen Lappen eine „Luxusperfusion“ erzeugen, die zu höheren Flusswerten im Vergleich zu *in vivo* perfundierten Lappen und letztendlich zu einer höheren Einheilrate führte, die sich statistisch nicht signifikant von der Sham-Gruppe unterschied. Eine territoriale Minderperfusion als Mitursache für die beobachtete metabolische Azidose lässt sich letztlich nicht ausschließen, diese scheint jedoch in Anbetracht der hohen Einheilrate zumindest teilweise reversibel gewesen zu sein. Ob und inwieweit sich die beobachteten negativen Einflussfaktoren (Hämolyse, mögliche lokale Minderperfusion) bei längeren Perfusionszeiten auf den Lappenerfolg auswirken, muss Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.5 AUSBLICK UND ALTERNATIVE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Auch wenn sich der Fokus dieser Arbeit klar auf den Vitalerhalt freier Gewebe mit dem theoretischen Ziel einer Gewebeverpflanzung ohne Gefäßanschluss konzentriert, sind die Anwendungsmöglichkeiten einer extrakorporalen Gewebepfusion weitaus vielseitiger. Gerade das Prinzip des abgekoppelten Kreislaufs eröffnet durch die freie Beeinflussungsmöglichkeit unzählige klinische und experimentelle Anwendungsgebiete (Tabelle 4.2), die hier nicht unerwähnt bleiben sollen.

Tabelle 4.2: Alternative Einsatzgebiete der Extrakorporalen Gewebepfusion

Einsatzgebiet	Anwendungsbeispiele
Gewebe- und Extremitätentransplantation	<ul style="list-style-type: none">• Rekonstruktionen in aussichtslosen Situationen• Errichten von Lappenbanken• Allotransplantationen• Vermeidung eines Reperfusionsschadens durch Auswaschen toxischer Metabolite• Re- und Transplantationen außerhalb einzelner Zentren
Überbrückung der Ischämiezeit freier Lappen	<ul style="list-style-type: none">• Vitalerhalt in Notfallsituationen• Überbrückung vor Revisions-OPs
Lappenmonitoring und Tweaking	<ul style="list-style-type: none">• Detailliertes Lappenmonitoring• Konditionierung von Gewebe bis zur Implantation• Radikalfänger zur Reduktion des Ischämieschadens
Isolierte Perfusion einzelner Regionen	<ul style="list-style-type: none">• Lokale Chemotherapie• Untersuchung pharmakologischer Effekte• Lokale Gabe von Pharmazeutika und Faktoren
Lehr- und Trainingsmodell	<ul style="list-style-type: none">• Lappenhebung unter lebensechten Bedingungen• Mikrochirurgische Anastomosen unter lebensechten Bedingungen
Einsparung von Tierversuchen	<ul style="list-style-type: none">• Pharmazeutische und kosmetische Industrie• Grundlagenforschung zu Ischämie und Reperfusion
Grundlagenforschung	<ul style="list-style-type: none">• Pharmazeutische und kosmetische Industrie• Grundlagenforschung zu Ischämie und Reperfusion• Tissue Engineering

4.5.1 GEWEBE- UND EXTREMITÄTENREPLANTATION

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Transplantationschirurgie gemacht. Allotransplantation von Gliedmaßen (MACHENS 2008) und selbst Gesichtstransplantationen sind heute möglich (PETRUZZO *et al.* 2012). Dennoch ist die Durchführung solcher Operationen auf Einzelfälle in speziellen Zentren beschränkt, was zum Teil an zeitlichen Faktoren liegt, durch die die Haltbarkeit solcher Transplantate eingeschränkt wird. Die ECP ermöglicht einen längeren Vitalerhalt, wodurch Allotransplantationen und Extremitätenreplantationen auch außerhalb einzelner Zentren denkbar wären. MAYER *et al.* (1994) spricht gar von der Möglichkeit Lappenbanken anzulegen. Heutzutage müssen abgetrennte Körperteile innerhalb von 4–6 Stunden revaskularisiert werden, um irreversible Gewebeschäden und einen ausgedehnten postischämischen Reperfusionsschaden zu verhindern. Unter Reperfusionsschaden versteht man alle toxischen Einflüsse auf eine Zelle während einer Ischämie und anschließender Reoxygenierung. Diese Reaktionen haben einen großen Einfluss auf den Erfolg oder Misserfolg von Transplantaten. Einen entscheidenden Anteil an diesem Phänomen haben vermutlich reaktive Sauerstoffintermediate wie Hyperoxid Anionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Singulett-Sauerstoff (1O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und andere Verbindungen (BRÖMME *et al.* 2002). Gemäß einem Leitspruch der Transplantationsmedizin, „life before limb“ (dt. Leben vor Körperteil), wird in kritischen Situation das Überleben des Patienten immer über das der abgetrennten oder eingeklemmten Extremität gestellt. Auch ein erfolgreich replantiertes Körperteil bedeutet für einen kritischen Patienten eine zusätzliche Kreislaufbelastung, zusätzliche Wundflächen und nicht selten eine zusätzliche Belastung durch toxische Metaboliten im Rahmen des Ischämieschadens. Wie uns die kürzlich durchgeführte erstmalige vierfache allogene Extremitätentransplantation, die trotz Amputation der transplantierten Gliedmaßen mit dem raschen Tod des Patienten endete, schmerzhaft vor Augen hält, ist, dass das Problem des Reperfusionsschadens nach großen Gewebeverpflanzungen nach wie vor ungelöst ist (SWANSON *et al.* 2014). Mit Hilfe einer ECP ließe sich vor erfolgter Replantation über eine Dialysevorrichtung oder die Zugabe von Radikalfängern toxische Metaboliten aus dem Gewebe auswaschen und die Extremität so lange vital erhalten, bis der Patient sich soweit stabilisiert hat, dass eine Replantation bzw. die Freigabe des Blutstroms vertretbar ist, ohne das Leben des Patienten zu gefährden.

4.5.2 ÜBERBRÜCKUNG DER ISCHÄMIEZEIT IN NOTFALLSITUATIONEN

Es gibt Situationen, in denen aufgrund unvorhersehbarer Umstände ein Lappen nach Hebung und Absetzen des Gefäßstiels nicht sofort an die Anschlussgefäße angeschlossen werden kann (BALLANTYNE *et al.* 1980). Zudem treten je nach gewähltem Lappentransplantat und Übung des Operateurs in ca. 17% der Fälle vaskuläre Komplikationen auf (WOLFF *et al.* 2008), die eine Revision erforderlich machen. Während die Erfolgsrate beim Primäreingriff ca. 95% beträgt, liegt die Erfolgsrate bei Revisionseingriffen mit 50% deutlich darunter (WOLFF *et al.* 2008), was in der Regel auf spät erkannte Komplikationen und lange Ischämieintervalle zurückzuführen ist. Wie bisher unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, sind wiederholte Ischämie-/Reperusionsintervalle für das Überleben mikrovaskulärer Lappen eine große Gefahr. Diese Beobachtung wird von USUI *et al.* (1985) bestätigt, die bei der extrakorporalen Perfusion von Hundegliedmaßen durch intermittierende Perfusion Ergebnisse erzielten, die mit Lappen vergleichbar waren, die über den selben Zeitraum nicht perfundiert worden waren. MAYER *et al.* (1992a) schlagen die extrakorporale Gewebepfusion als Methode zur Überbrückung der intraoperativen Ischämiezeit während mikrochirurgischer Rekonstruktionen vor. Eine Anwendung zur temporären Vitalerhaltung bis zum Eintreffen in den OP ist darüber hinaus denkbar, soweit die Anschlussgefäße gut zugänglich sind. Die Möglichkeit der Überbrückung der Ischämiezeit durch temporären extrakorporalen Vitalerhalt konnte unsere Arbeitsgruppe bereits klinisch unter Beweis stellen (bisher unveröffentlichte Daten). In einem Einzelfall war es aufgrund unvorhersehbarer intraoperativer Komplikationen zu einer Verzögerung der mikrochirurgischen Anastomose, nach Absetzen eines für die Rekonstruktion eines intraoralen Defekts gehobenen Radialislappens, gekommen. Das verwendete extrakorporale Perfusionssystem ließ sich innerhalb weniger Minuten steril aufbauen und erlaubte nach Kanülierung der A. radialis und beider Begleitvenen (Abb. 4.3) die ECP des Lappens mit vollheparinisierendem, autologem Vollblut. Analog zu unseren Tierexperimenten färbte sich der Lappen unmittelbar nach Perfusionsbeginn rosig und wies ein deutliches Rekapillarisierungsphänomen auf, das sich durch Anhebung des Volumenflusses weiter steigern ließ (Abb. 4.3, Einzelbilder 1–3). Ein konstanter venöser Rückfluss sowie eine hohe arteriovenöse Sauerstoffdifferenz bestätigten die Vitalität des Lappens. Der Lappen zeigte nur eine geringe Ödemneigung und wurde mit einem Volumenfluss von 5 ml/min für etwa vier Stunden vital erhalten, bis mit der Anastomose begonnen werden konnte. Der Lappen heilte anschließend folgenlos ein. Das Vorhaben war von der zuständigen Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar (Nr. 2922/10 und 5836/13) im Vorfeld befürwortet worden.

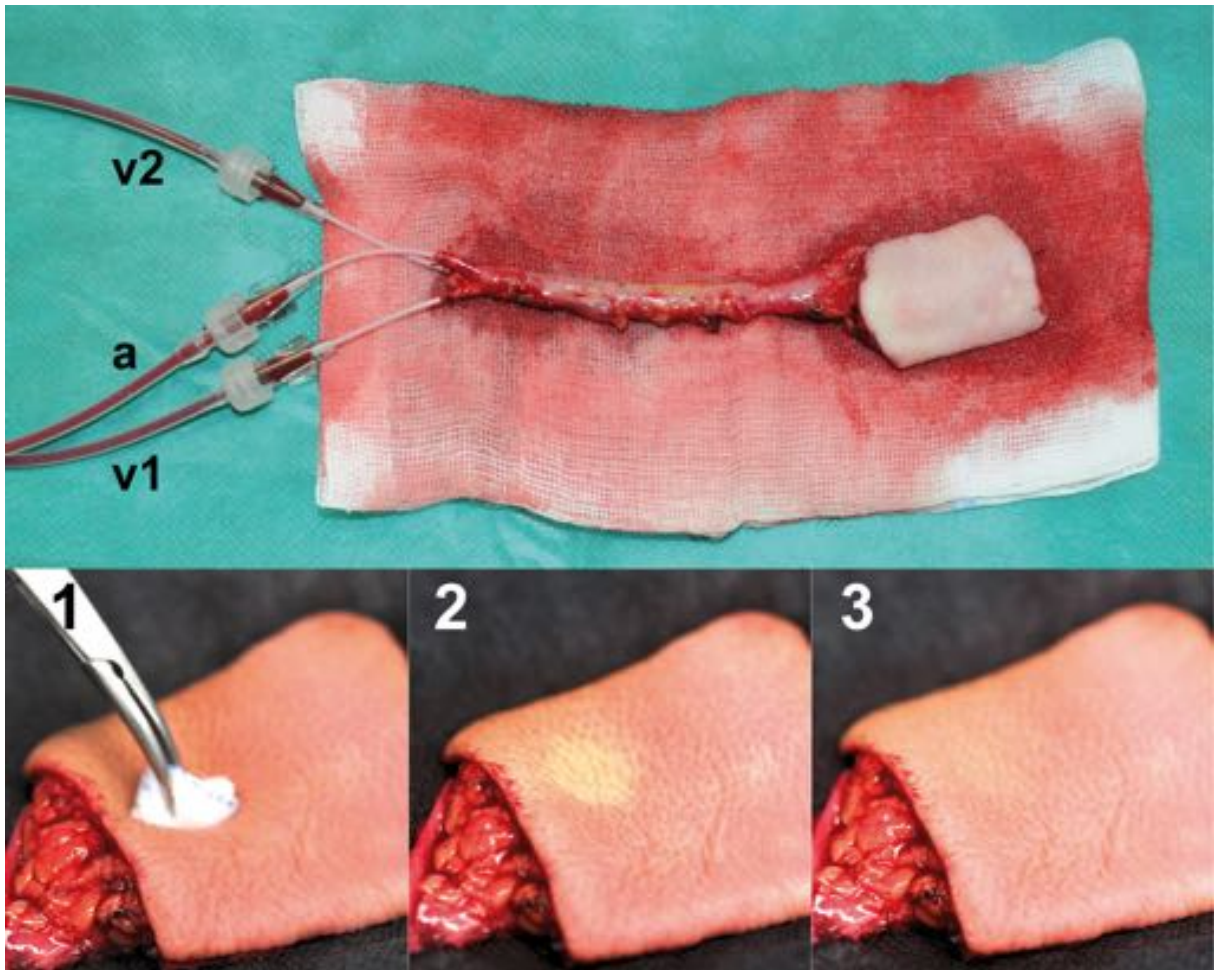


Abb. 4.3: Extrakorporal perfundierter Radialislappen. (Oben) kanülierter, extrakorporal perfundierter Radialislappen mit rosigem Kolorit und Pitting entlang der Hautinsel und des Gefäßstiels. (2) Wenige Sekunden nach Beginn der extrakorporalen Perfusion lässt sich ein deutlicher Flush als Zeichen der erfolgreichen Reperfusion auslösen. Dazu wird mit einem Tupfer die Haut komprimiert (1). Nach dem Loslassen ist die Durchblutung lokal kompromittiert, das Gewebe färbt sich hell (2). Innerhalb von Sekunden färbt sich die Haut mit der Reperfusion erneut rosig (3).

4.5.3 LAPPENMONITORING UND TWEAKING

Zwei große Vorteile, die sich aus der Abkopplung des Gewebes vom Körperkreislauf und der Ankopplung an ein steuerbares technisches System ergeben, sind die beliebig erweiterbaren, kontinuierlichen Monitoringmöglichkeiten (MAYER *et al.* 1992b) und die Möglichkeit der Einflussnahme auf das Gewebe, durch Veränderungen der Einstellungen des Systems oder der Zusammensetzung des Perfusats („Tweaking“, *deu.* Optimieren) ohne Beeinflussung des Körperkreislaufs.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Entwicklung eines funktionstüchtigen ECP-Systems, mit dessen Hilfe die extrakorporale Perfusion und Oxygenierung freier Gewebetransplantate im Tiermodell möglich ist, eröffnet unzählige Möglichkeiten, das Verhalten verschiedener Gewebe (Haut, Fett, Muskel etc.) während extrakorporaler Perfusion unter variablen Bedingungen (Perfusatzusammensetzung, Perfusionsdrücke, Temperatur, Antikoagu-

lation) zu untersuchen. Mit zunehmendem Verständnis der Reaktionen unterschiedlicher Gewebe auf ECP, können viele Faktoren wie die Perfusatzusammensetzung und –temperatur oder das O₂/CO₂-Verhältnis weiter optimiert werden, um die Bedingungen für das perfundierte Gewebe weiter zu verbessern.

Kühlung (GREANEY *et al.* 2010), Erwärmung (VAN GINKEL *et al.* 1995) und Druckerhöhung (LANE *et al.* 2008) sind physikalische Maßnahmen, die in der Klinik bei der Perfusion isolierter Gewebe bereits therapeutisch eingesetzt werden. Neben physikalischen Maßnahmen können dem verwendeten Perfusat Pharmakologika, wie beispielsweise Rheologica, Spasmolytika oder Wachstumsfaktoren beigemischt werden, die lokal, und ohne systemische Wirkung, fördernd auf die Lappeneinheilung wirken könnten. Die häufigsten Gründe für den Misserfolg eines mikrovaskulären Transplantates sind Thromben und Vasospasmen, die meist durch die Manipulation der anfälligen Mikrogefäße oder durch technische Fehler bei der Anastomosierung ausgelöst werden (WOLFF *et al.* 2008). Zur Vermeidung von Gefäßspasmen und Verbesserung der Mikrozirkulation innerhalb des Gewebes wurden bereits eine ganze Reihe pharmakologischer Substanzen experimentell und klinisch eingesetzt. Darunter Spasmolytika wie Lidocain (FOWLER *et al.* 1999), Rheologica wie Pentoxifylline (KNOX *et al.* 1989), Antikoagulanzen wie Heparin oder Zitrat (FOWLER *et al.* 1999), Radikalfänger wie Gluthation (KUPATT *et al.* 2004) und andere Pharmakologika, von denen eine Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens bekannt ist (SOUTHARD UND BELZER 1995; MATSUMOTO UND KURODA 2002; AHLENSTIEL *et al.* 2006). Diese Substanzen können systemisch verabreicht (Heparin) oder auf die Mikrogefäße lokal aufgetropft werden (Lidocain). Durch die ECP freier Gewebetransplantate wird das Transplantat von der Mikroanastomose und den damit verbundenen Fehlerquellen unabhängig. Zudem kann das Perfusat durch den Zusatz vasoaktiver Substanzen ergänzt werden, die dann lokal und endoluminal (endothel-nah) wirken können, ohne dass eine unerwünschte systemische Arzneimittelwirkung befürchtet werden müsste. Auf diese Weise konnten wir bereits die Applikation des Wachstumsfaktors VEGF durch Zumischung zum Perfusat in einem Pilotversuch, während extrakorporaler Perfusion von Leistenlappen im Rattenmodell testen, und stellten hohe Einheilraten fest (vorläufige Daten). MULLER *et al.* (2013) diskutieren die Möglichkeit der Reduktion eines möglichen Ischämie-/Reperfusionsschadens einer extrakorporal vitalerhaltenen Extremität vor Replantation durch Zumischung Komplement-inhibierender Faktoren zum Perfusat.

4.5.4 ISOLIERTE PERFUSION EINZELNER REGIONEN

Das Prinzip der *ex vivo* Perfusion ermöglicht die isolierte Perfusion einzelner Körperregionen, wodurch die Verabreichung von Medikamenten, die den Körperkreislauf nicht belasten sollen, möglich wird. Diese Methode wird in der Onkologie bereits therapeutisch im Sinne einer lokalen Chemotherapie einzelner Extremitäten bei inoperablen Weichteil- und Knochensarkomen (VAN GINKEL *et al.* 1999) oder Melanomen (MCBRIDE 1970) eingesetzt. Die temporäre, hypertensive, extrakorporale Perfusion (HELP) kritisch ischämischer Extremitäten ist eine weitere klinische Anwendung extrakorporaler Perfusion isolierter Regionen (LANE *et al.* 2008). Ein ECP-System kann auch verwendet werden, um in Fällen ausgedehnter arterieller oder venöser Thrombosen thrombolytische Medikamente hochdosiert in die betroffene Extremität zu infundieren, ohne den Körperkreislauf zu belasten (MUMME *et al.* 1991; QUINONES-BALDRICH *et al.* 1994).

Eine lokale Applikation von Wachstumsfaktoren wäre, gerade in kompromittierten Wunden in Hinblick auf das Ziel einer möglichst frühen Einheilung ohne Anschlussgefäße, eine weitere vielversprechende Anwendungsmöglichkeit für unser System. Das enorme Potential von VEGF auf die Einheilung epigastrischer Lappen im Rattenmodell konnte unsere Arbeitsgruppe bereits demonstrieren (MÜCKE *et al.* 2013). Einer klinischen Anwendung stehen jedoch nach wie vor große Bedenken bezüglich der Sicherheit und Fragen zur Darreichungsform und -dosis im Weg. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren in das Perfusat eröffnet die ECP freier Gewebetransplantate eine Möglichkeit, diese Faktoren lokal am gewünschten Wirkort, also ohne Einfluss auf den Körperkreislauf, dosiert einzusetzen. Dadurch ließen sich selbst höhere Dosen risikoarm und schnell am gewünschten Wirkort einsetzen. Mit zunehmender Einheilung des Transplantates und damit verbundener Drainage von Blut aus dem Transplantat in den Körperkreislauf stiege zwar das Risiko einer systemischen Wirkung der zugeetzten Faktoren, doch selbst wenn die Zugabe von Medikamenten nur kurzfristig erfolgen würde, könnte dies, gerade bei Anwendung in der wichtigen Frühphase der Wundheilung, einen entscheidenden Vorteil für die Einheilung des Transplantates bedeuten. Aufgrund ihrer gewebeproliferativen und damit potentiell karzinogenen Wirkung sind Wachstumsfaktoren bei Tumorpatienten generell bedenklich. Daher verbietet sich auch der Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Perfusat bei der Verpflanzung eines extrakorporal perfundierten Lappen-transplantates in einen frischen Tumorsektionsdefekt. Schließlich ist selbst bei histologisch gesicherter R0-Situation nicht ausgeschlossen, dass einzelne residuelle Tumorzellnester oder Mikrometastasen im Randbereich der Resektion vorhanden sind, weshalb selbst bei lokaler Anwendung von Wachstumsfaktoren von einem erhöhten Frührezidivrisiko ausgegangen werden muss. Hier ist jedoch weiterer Forschungsbedarf nötig.

Im Gebiet des Tissue-Engineering wäre zudem der Einsatz eines membranoxxygenierten Perfusionssystems zur Aufrechterhaltung der Vitalität gezüchteter Zellen oder Gewebe denkbar.

4.5.5 LEHR- UND TRAININGSMODELL

Die von MAYER (2002) beschriebene Eignung der extrakorporalen Perfusion als Lehr- und Trainingsmodell konnte unsere Arbeitsgruppe bereits mit einem System zeigen, das einen pulsatilen Blutfluss durch Kadavergewebe ermöglicht (WOLFF *et al.* 2014). Auf diese Weise können lebensrechte Präparationsbedingungen simuliert und der Erfolg einer Anastomose kontrolliert werden ohne auf Tierversuche zurückgreifen zu müssen. Die bisher für die Ausbildung von Mikrochirurgen unabdingbaren Trainingseinheiten am lebenden Tier könnten durch diese neue Technik möglicherweise überflüssig werden.

4.5.6 EINSPARUNG VON TIERVERSUCHEN

MAYER (1998) hebt ebenfalls die extrakorporale Gewebepfusion als eine Möglichkeit hervor, Tierversuche einzusparen. Durch die Entnahme und Vitalerhaltung multipler Gewebe und Organe aus einem Versuchstier ließe sich die Anzahl verbrauchter Tiere und notwendiger Operationen reduzieren und Behinderungen und Schmerzen vermeiden (MAYER 1998). Es sei möglich, Organe oder Gewebe von Tieren zu entnehmen die im Schlachthof getötet wurden (MAYER 1998). In der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie wird das Prinzip der extrakorporalen Gewebepfusion zur Untersuchung der Pharmakodynamik und Toxikologie bei der perkutanen Resorption von Medikamenten bereits eingesetzt (NOGUEIRA *et al.* 1999; WAGNER *et al.* 2003).

4.5.7 GRUNDLAGENFORSCHUNGSMODELL

Auf die hervorragenden Monitoring- und Tweakingmöglichkeiten eines extrakorporalen Perfusionssystems wurde bereits in Kapitel 4.5.3 auf Seite 135 hingewiesen. Diese Überwachungs- und Kontrollmöglichkeiten machen die extrakorporalen Perfusion zum idealen Grundlagenforschungsmodell zur Analyse (patho-) physiologischer und biochemischer Vorgänge innerhalb des Gewebes unter variablen Einflüssen. Ein *ex vivo* Perfusionsmodell löst das perfundierte Gewebe vollständig von systemischen Einflüssen neurologischer, hormoneller oder chemischer Natur, die Daten experimenteller, *in vivo* und klinischer Studien verfälschen könnten (GRAVANTE *et al.* 2010). Dadurch lassen sich beispielsweise die biochemischen Parameter des Lappenstoffwechsels während Ischämie und Reperfusion untersuchen. Eine Berner Arbeitsgruppe (MULLER *et al.* 2013) bediente sich in einer aufwändigen Studie zur Untersuchung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens nach verzögerter Reperfusion amputierter Schweinevorderfüße eines extrakorporalen Perfusionssystems. Im Gegensatz zu den für solche Untersuchungen gebräuchlichen Tourniquet-Modellen an Rattenhinterläufen erfordere die extrakorporale Gliedmaßenperfusion kein hochspezialisiertes mikrovaskuläres

Equipment, um menschenähnliche chirurgische und metabolische Verhältnisse im Schweinemodell zu simulieren (MULLER *et al.* 2013). MAYER *et al.* (1998; 2002) weisen zudem auf die Möglichkeit der Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen unter Einfluss pharmakologischer Substanzen oder Kosmetika als „tierverbrauchsarmes“ System hin. Das Prinzip der extrakorporalen Perfusion wird daher, wie oben beschreiben, bereits in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie angewendet (NOGUEIRA *et al.* 1999; WAGNER *et al.* 2003).

4.6 FAZIT

Während das Prinzip der extrakorporalen Perfusion zur Vitalerhaltung bestimmter Organe bereits routinemäßig eingesetzt wird, beruht unser Wissen über die Vitalerhaltung freier Gewebetransplantate mit dieser Technik auf einzelnen tierexperimentellen Studien und einer Hand voll klinischen Fallberichten über Amputationsopfer. Worin sich die wenigen Studien, die zu diesem Thema existieren, einig sind, ist, dass eine extrakorporale Vitalerhaltung freier Gewebetransplantate oder amputierter Extremitäten prinzipiell möglich ist. Unsere Studie liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Vorgänge innerhalb des Gewebes während extrakorporaler Perfusion, und beschreibt erstmals systematisch und umfassend die erfolgreiche Replantation mikrovaskulärer Lappen nach Perfusion über einen vollständig abgekoppelten Kreislauf im Kleintiermodell. Dazu wurde ein bestehendes Tiermodell (epigastrischer Lappen der Ratte) erfolgreich in das Setting der extrakorporalen Perfusion transferiert und über entsprechende Kontrollgruppen als Modell für weitere Untersuchungen etabliert. Aufgrund der Justierbarkeit ist unser System zudem problemlos auf Großtiermodelle oder Organperfusionsen übertragbar. Die erfolgreiche Umsetzung dieses Wissens in die klinische Anwendung würde die therapeutischen Möglichkeiten in Fällen erweitern, in denen eine Rekonstruktion mit den herkömmlichen Techniken nicht mehr sinnvoll zu erreichen ist. Ferner kann das gewonnene Wissen einen wichtigen Beitrag für die Transplantationsmedizin zur Replantation amputierter Körperteile liefern. Die extrakorporale Gewebepfusion ist ein hochkomplexes Verfahren, bei dem zahlreiche Parameter, wie das Verhalten unterschiedlicher Gewebe auf Ischämie und Reperfusion, die Wahl geeigneter Perfusionsdrücke, das optimale O₂/CO₂-Verhältnis und die Temperatur und Zusammensetzung des Perfusats berücksichtigt werden müssen. Neben dem Jonglieren dieser Parameter wirft die ECP freier Gewebetransplantate zudem eine Reihe bisher ungelöster Probleme, wie die mikrobielle Besiedelung der Gewebe auf. Vor einer möglichen klinischen Anwendung müssen deshalb zuerst weitere wichtige Zusammenhänge der physiologischen und biochemischen Vorgänge im Gewebe während extrakorporaler Perfusion untersucht werden. Gerade für solche Fragestellungen bietet sich das von uns entwickelte Perfusionssystem jedoch geradezu an.

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung eines extrakorporalen Perfusionssystems zur Vitalerhaltung freier Gewebetransplantate im Kleintiermodell

Einleitung: Der Erfolg mikrovaskulärer Rekonstruktionen ist auf das Vorhandensein adäquater Anschlussgefäße angewiesen. Eine temporäre Vitalerhaltung freier Lappen durch extrakorporale Perfusion (ECP) könnte den freien Gewebetransfer auch in gefäßverarmte Regionen ermöglichen. Ziel der vorliegenden Studie war die Entwicklung und Evaluation eines ECP-Systems zum Vitalerhalt freier Lappen im Kleintiermodell. *Methodik:* Vorversuche umfassten Flussmessungen an epigastrischen und femoralen Gefäßen in 12 Ratten zur Etablierung geeigneter Perfusionsdrücke und Flussvolumina sowie Untersuchungen zu den Hämolyseeigenschaften des entwickelten Systems an humanem und murinem Vollblut. In einem zweiten Schritt wurden epigastrische Lappen der Ratte über einen Zeitraum von 8 Stunden mit verdünntem autologem Vollblut perfundiert und anschließend mikrochirurgisch auf ein zweites Tier transferiert. Als Vergleichsgruppen dienten 8 Stunden *in vivo* perfundierte Lappen (n=8, Positivkontrolle), 8 Stunden Ischämie (n=8, Negativkontrolle) und Lappenhebung (n=8, Sham-Operation). Die Vitalität der Lappen wurde gewebe-photospektrometrisch, fluoreszenzangiographisch, histologisch und laborchemisch sowie durch planimetrische Messung der Nekroserate beurteilt. *Ergebnisse:* Mit hochnormalen Flusswerten (2,2 ml/min) ließ sich die Perfusion epigastrischer Lappen über einen Zeitraum von acht Stunden aufrechterhalten. Kalium und pH blieben ohne Einflussnahme auf die Perfusatzusammensetzung im Normbereich. Einer nach 4 Stunden evidenten Hämolyse wurde durch regelmäßige Perfusatwechsel entgegengewirkt. Die extrakorporal perfundierten Lappen waren nach 7 Tagen zu einem hohen Prozentsatz eingeeilt (Nekroserate 29,7%) und unterschieden sich statistisch nicht von der Sham-Gruppe (7,8%), während nicht perfundierte Lappen nahezu vollständig nekrotisch wurden (98,3%). *In vivo* perfundierte Lappen wiesen eine Nekroserate von 54,2% auf. *Schlussfolgerung:* Das von uns entwickelte System ermöglicht die extrakorporale Vitalerhaltung freier, kleinvolumiger Lappen über einen Zeitraum von 8 Stunden. Die Studie liefert wichtige Erkenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge während extrakorporaler Gewebepfusion und legt einen wesentlichen Grundstein für eine anastomosefreie Gewebetransplantation. Weitere zukunftsweisende Anwendungsgebiete der extrakorporalen Gewebepfusion in Therapie, Forschung und Lehre werden diskutiert.

Schlagwörter: *Ex vivo* Perfusion · Extrakorporale Perfusion · Extrakorporale Membranoxygenation (ECMO) · Ratte · epigastrischer Lappen · mikrovaskuläre Lappen · freie Lappen · Ischämie-/Reperfusionsschaden · Transplantation

SUMMARY

Development of an Extracorporeal Perfusion System for the Vital Storage of Free Flaps in a Small Animal Model

Introduction: For microvasculatory reconstructions to be successful, the presence of appropriate local recipient vessels is mandatory. A temporary vital storage of free flaps by means of extracorporeal perfusion (ECP) might pave the grounds for free flap transplantation to vessel-depleted areas. Aim of the presented study was the development and evaluation of an ECP system for the vital storage of small animal free flaps. *Methods:* A preliminary study was conducted to establish proper perfusion values. Therefore, flow measurements of the epigastric and femoral vessels were performed in 12 rats. Lactate dehydrogenase activity and haptoglobin levels were measured in human and murine blood during circulation through the developed perfusion system. In a subsequent *in vivo* study, the system was evaluated during an 8 hour perfusion of 8 rat epigastric flaps before microvascular flap transfer to a recipient rat. Controls comprised sham-operation (n=8), 8 hour ischemia (n=8) and 8 hour *in vivo* perfusion (n=8). Blood gas analysis of the perfusate (diluted autologous blood) was regularly performed during perfusion. Flaps were monitored using photo-tissuespectrometry and Indocyanine-Green angiography. Evaluations were complemented by planimetric assessment of necrotic areas and light microscopy at day 7. *Results:* The flowrate of the femoral artery ranged between 0.3 and 2.4 ml/min (0.7 median). Lactate dehydrogenase (LDH) and Haptoglobin showed a significant increase, indicating a progressive hemolysis after four hours. With high-normal flow settings (2.2 ml/min), ECP could be established and maintained for 8 hours with constant potassium and pH levels. To minimize a negative effect of progressive hemolysis, the perfusate was changed every 4 hours. Rate of necrosis of extracorporeally perfused flaps (29.7%) did not differ significantly from the sham group (7.8%) and was lower than *in vivo* perfused flaps (54.2%), although not statistically significant. An 8 hour ischemia period led to total flap necrosis in all cases (98.3%). Angiographic and histological findings confirm these observations. *Conclusion:* As our study shows, vital storage of rat epigastric flaps by means of ECP is possible over a period of 8 hours. The results of the study provide important insights on the pathophysiological processes during extracorporeal tissue perfusion and lay the foundations to microvascular tissue transfer to vessel-depleted areas without anastomosis. Other forward-looking applications of ECP in the fields of therapy, teaching and research are being discussed.

Keywords: ex vivo perfusion · extracorporeal perfusion · extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) · rat model · epigastric flap · microvascular flap · free flap · ischemia/ reperfusion damage

ANHANG

LITERATURVERZEICHNIS

- Acland, R. D. (1990). "Refinements in lower extremity free flap surgery." *Clin Plast Surg* **17**(4): 733-744.
- Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Kohler, H. und Kuhlmann, M. K. (2006). "Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions." *Transplantation* **81**(2): 231-239.
- Alghamdi, A. A. und Latter, D. A. (2006). "Pulsatile versus nonpulsatile cardiopulmonary bypass flow: an evidence-based approach." *J Card Surg* **21**(4): 347-354.
- Arai, K., Hotokebuchi, T., Miyahara, H., Mohtai, M., Kitadai, H. K., Sugioka, Y. und Kaibara, N. (1993). "Successful long-term storage of rat limbs. The use of simple immersion in Euro-Collins solution." *Int Orthop* **17**(6): 389-396.
- Ariyan, S. (1979). "The pectoralis major myocutaneous flap. A versatile flap for reconstruction in the head and neck." *Plast Reconstr Surg* **63**(1): 73-81.
- Aviv, J. E., Urken, M. L., Vickery, C., Weinberg, H., Buchbinder, D. und Biller, H. F. (1991). "The combined latissimus dorsi-scapular free flap in head and neck reconstruction." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **117**(11): 1242-1250.
- Aymard, J. L. (1917). "Nasal reconstruction." *The Lancet* **190**(4920): 888-892.
- Bakamjian, V. Y. (1965). "A Two-Stage Method for Pharyngoesophageal Reconstruction with a Primary Pectoral Skin Flap." *Plast Reconstr Surg* **36**: 173-184.
- Baker, H. J., Lindsey, R. und Wesibroth, S. H. (1979). *The Laboratory Rat: Biology and Diseases*. London, Academic Press Inc.
- Baksaas, S. T., Flom-Halvorsen, H. I., Ovrum, E., Videm, V., Mollnes, T. E., Brosstad, F. und Svennevig, J. L. (1999). "Leucocyte filtration during cardiopulmonary reperfusion in coronary artery bypass surgery." *Perfusion* **14**(2): 107-117.
- Balasundaram, I., Al-Hadad, I. und Parmar, S. (2012). "Recent advances in reconstructive oral and maxillofacial surgery." *Br J Oral Maxillofac Surg* **50**(8): 695-705.
- Ballantyne, D. L., Reid, C. A., Harper, A. D. und Shaw, W. W. (1980). "The effects of short-term preservation on microvascular free groin flaps in rats." *J Microsurg* **2**(2): 101-105.
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM): "Hydroxyethylstärke (HES): Empfehlung des PRAC.", Mitteilung vom 24. Juni 2013.
- Black, M. J., Chait, L., O'Brien, B. M., Sykes, P. J. und Sharzer, L. A. (1978). "How soon may the axial vessels of a surviving free flap be safely ligated: a study in pigs." *Br J Plast Surg* **31**(4): 295-299.
- Blaisdell, F. W. (2002). "The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review." *Cardiovasc Surg* **10**(6): 620-630.
- Blondeel, N., Vanderstraeten, G. G., Monstrey, S. J., Van Landuyt, K., Tonnard, P., Lysens, R., Boeckx, W. D. und Matton, G. (1997). "The donor site morbidity of free DIEP flaps and free TRAM flaps for breast reconstruction." *Br J Plast Surg* **50**(5): 322-330.
- Boldt, J., Knothe, C., Zickmann, B., Andres, P., Dapper, F. und Hempelmann, G. (1993). "Influence of different intravascular volume therapies on platelet function in patients undergoing cardiopulmonary bypass." *Anesth Analg* **76**(6): 1185-1190.
- Bourget, A., Chang, J. T., Wu, D. B., Chang, C. J. und Wei, F. C. (2011). "Free flap reconstruction in the head and neck region following radiotherapy: a cohort study identifying negative outcome predictors." *Plast Reconstr Surg* **127**(5): 1901-1908.
- Bozikov, K. und Arnez, Z. M. (2006). "Factors predicting free flap complications in head and neck reconstruction." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **59**(7): 737-742.

- Brömme, H. J., Loertzer, H. und Akçetin, Z. (2002). "Der postischämische Reperfusionsschaden - Biochemische und methodische Grundlagen." *Der Urologe* **41**(2): 159-163.
- Bullocks, J., Naik, B., Lee, E. und Hollier, L., Jr. (2006). "Flow-through flaps: a review of current knowledge and a novel classification system." *Microsurgery* **26**(6): 439-449.
- Ceran, C., Demirseren, M. E., Sarici, M., Durgun, M. und Tekin, F. (2013). "Tongue flap as a reconstructive option in intraoral defects." *J Craniofac Surg* **24**(3): 972-974.
- Chait, L. A., May, J. W., Jr., O'Brien, B. M. und Hurley, J. V. (1978). "The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps." *Plast Reconstr Surg* **61**(3): 421-430.
- Chan, R. C. und Chan, J. Y. (2014). "Deltapectoral flap in the era of microsurgery." *Surg Res Pract* **2014**: 420892.
- Chang, E. I., Bonillas, R. G., El-ftesi, S., Chang, E. I., Ceradini, D. J., Vial, I. N., Chan, D. A., Michaels, J. t. und Gurtner, G. C. (2009). "Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds." *FASEB J* **23**(3): 906-915.
- Chang, K. P., Lee, H. C., Lai, C. S. und Lin, S. D. (2007). "Use of single saphenous interposition vein graft for primary arterial circuit and secondary recipient site in head and neck reconstruction: a case report." *Head Neck* **29**(4): 412-415.
- Fa. Charles River, Kißlegg (1984). "Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Fischer 344 Rats-CDF® (F-344)CrIBR as a Function of Sex and Age." Zugriff erfolgt am 22.08.2014, auf http://www.criver.com/techdocs/84jan_tb/t84tab04.htm12/19/2003.
- Chen, Z. W. und Yan, W. (1983). "The study and clinical application of the osteocutaneous flap of fibula." *Microsurgery* **4**(1): 11-16.
- Cherix, K. C., Nijhuis, T. H. und Mureau, M. A. (2013). "Osteoradionecrosis of the jaws: a review of conservative and surgical treatment options." *J Reconstr Microsurg* **29**(2): 69-75.
- Chiu, E. S., Liu, P. H. und Friedlander, P. L. (2009). "Supraclavicular artery island flap for head and neck oncologic reconstruction: indications, complications, and outcomes." *Plast Reconstr Surg* **124**(1): 115-123.
- Chubb, D., Rozen, W. M. und Ashton, M. W. (2010). "Early survival of a compromised fasciocutaneous flap without pedicle revision: monitoring with photoplethysmography." *Microsurgery* **30**(6): 462-465.
- Clark, J. R., McCluskey, S. A., Hall, F., Lipa, J., Neligan, P., Brown, D., Irish, J., Gullane, P. und Gilbert, R. (2007). "Predictors of morbidity following free flap reconstruction for cancer of the head and neck." *Head & neck* **29**(12): 1090-1101.
- Cohn, A. B., Lang, P. O., Agarwal, J. P., Peng, S. L., Alizadeh, K., Stenson, K. M., Haraf, D. J., Cohen, E. E., Vokes, E. E. und Gottlieb, L. J. (2008). "Free-flap reconstruction in the doubly irradiated patient population." *Plast Reconstr Surg* **122**(1): 125-132.
- Colletti, G., Autelitano, L., Tewfik, K., Rabbiosi, D. und Biglioli, F. (2012). "Autonomized flaps in secondary head and neck reconstructions." *Acta Otorhinolaryngol Ital* **32**(5): 329-335.
- Conley, J. (1972). "Use of composite flaps containing bone for major repairs in the head and neck." *Plast Reconstr Surg* **49**(5): 522-526.
- Constantinescu, M. A., Knall, E., Xu, X., Kiermeir, D. M., Jenni, H., Gyax, E., Rieben, R., Banic, A. und Vogelien, E. (2010). "Preservation of Amputated Extremities by Extracorporeal Blood Perfusion; a Feasibility Study in a Porcine Model." *The Journal of surgical research*.
- Cooley, B. C., Tadych, K. L. und Gould, J. S. (1990). "Perfusion of free flaps with heparinized whole blood during ischemic storage." *J Reconstr Microsurg* **6**(1): 49-53.
- Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J. F., Chao, K. S., Schultz, C. J., Lee, N., Fu, K. K. und Radiation Therapy Oncology Group, I. (2004). "Postoperative concurrent

- radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **350**(19): 1937-1944.
- Corbitt, C., Skoracki, R. J., Yu, P. und Hanasono, M. M. (2014). "Free flap failure in head and neck reconstruction." Head Neck **36**(10): 1440-1445.
- David H. Song, M., Ginard Henry, M., Russell R. Reid, M., PhD, Liza C. Wu, M., Garrett Wirth, M. und Amir H. Dorafshar, M. (2007). "Essentials for Students Workgroup." The American Society of Plastic Surgeons® (ASPS®).
- Delorme, T. L., Shaw, R. S. und Austen, W. G. (1964a). "A Method of Studying "Normal" Function in the Amputated Human Limb Using Perfusion." J Bone Joint Surg Am **46**: 161-164.
- Delorme, T. L., Shaw, R. S. und Austen, W. G. (1964b). "Musculo-Skeletal Functions in the Amputated Perfused Human Being Limb." Surg Forum **15**: 450-452.
- Domingo-Pech, J., Garriga, J. M., Toran, N., Rusinol, M., Girvent, F., Rosines, D., Rodriguez, E. und Tegiacchi, M. (1991). "Preservation of the amputated canine hind limb by extracorporeal perfusion." Int Orthop **15**(4): 289-291.
- Dragu, A., Birkholz, T., Kleinmann, J. A., Schnurer, S., Munch, F., Cesnjevar, R., Schmidt, J., Taeger, C., Kneser, U. und Horch, R. E. (2010). "Extracorporeal perfusion of free muscle flaps in a porcine model using a miniaturized perfusion system." Archives of orthopaedic and trauma surgery.
- Dragu, A., Jeffries, J., Bach, A. D. und Horch, R. E. (2008). "Prinzipien der Lappenplastiken: Eine Übersicht." CHAZ **9**(2): 59-66.
- Dragu, A., Kleinmann, J. A., Taeger, C. D., Birkholz, T., Schmidt, J., Geppert, C. I., Prabst, K., Unglaub, F., Munch, F., Weyand, M., Kneser, U. und Horch, R. E. (2012a). "Immunohistochemical evaluation after ex vivo perfusion of rectus abdominis muscle flaps in a porcine model." Plast Reconstr Surg **130**(2): 265e-273e.
- Dragu, A., Schnurer, S., Surmann-Schmitt, C., Unglaub, F., Kneser, U. und Horch, R. E. (2011a). "Expression of HIF-1alpha in ischemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer." Plast Reconstr Surg **127**(6): 2293-2300.
- Dragu, A., Schnurer, S., Surmann-Schmitt, C., von der Mark, K., Sturzl, M., Unglaub, F., Wolf, M. B., Leffler, M., Beier, J. P., Kneser, U. und Horch, R. E. (2011b). "Gene expression analysis of ischaemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer." Journal of cellular and molecular medicine **15**(4): 983-993.
- Dragu, A., Taeger, C. D., Buchholz, R., Sommerfeld, B., Hubner, H., Birkholz, T., Kleinmann, J. A., Munch, F., Horch, R. E. und Prabst, K. (2012b). "Online oxygen measurements in ex vivo perfused muscle tissue in a porcine model using dynamic quenching methods." Arch Orthop Trauma Surg **132**(5): 655-661.
- Esper, S. A., Levy, J. H., Waters, J. H. und Welsby, I. J. (2014). "Extracorporeal membrane oxygenation in the adult: a review of anticoagulation monitoring and transfusion." Anesth Analg **118**(4): 731-743.
- Ethunandan, M., Cole, R. und Flood, T. R. (2007). "Corlett loop for microvascular reconstruction in a neck depleted of vessels." Br J Oral Maxillofac Surg **45**(6): 493-495.
- Fasunla, A. J., Greene, B. H., Timmesfeld, N., Wiegand, S., Werner, J. A. und Sesterhenn, A. M. (2011). "A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-negative neck." Oral Oncol **47**(5): 320-324.
- Feihl, F., Liaudet, L. und Waeber, B. (2009). "The macrocirculation and microcirculation of hypertension." Curr Hypertens Rep **11**(3): 182-189.
- Fichter, A. M., Borgmann, A., Ritschl, L. M., Mitchell, D. A., Wagenpfeil, S., Dornseifer, U., Wolff, K. D. und Mücke, T. (2014). "Perforator flaps--how many perforators are necessary to keep a flap alive?" Br J Oral Maxillofac Surg **52**(5): 432-437.

- Fowler, J. D., Li, X. und Cooley, B. C. (1999). "Brief ex vivo perfusion with heparinized and/or citrated whole blood enhances tolerance of free muscle flaps to prolonged ischemia." *Microsurgery* **19**(3): 135-140.
- Fox, I., Brooker, G., Heseltine, D., Essex, H. und Wood, E. (1956). "New dyes for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygenation saturation." *Circulation* **14**: 937-938.
- Fujioka, M. (2014). "Surgical Reconstruction of Radiation Injuries." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**(1): 25-37.
- Fukui, A., Inada, Y., Maeda, M., Tamai, S., Mizumoto, S., Yajima, H. und Sempuku, T. (1989). "Pedicled and "flow-through" venous flaps: clinical applications." *J Reconstr Microsurg* **5**(3): 235-243.
- Futrell, J. W., Johns, M. E., Edgerton, M. T., Cantrell, R. W. und Fitz-Hugh, G. S. (1978). "Platysma myocutaneous flap for intraoral reconstruction." *Am J Surg* **136**(4): 504-507.
- Georgiade, N., Peschel, E., Georgiade, R. und Brown, I. (1956). "A clinical and experimental investigation of the preservation of skin." *Plast Reconstr Surg (1946)* **17**(4): 267-275.
- Gießler, G. A. (2013). "Der mikrochirurgische Gefäßanschluss am bestrahlten und gefäßverarmten Hals." *Face* **1** (2013): 6-9.
- Giunta, R. E., Holzbach, T., Taskov, C., Holm, P. S., Brill, T., Busch, R., Gansbacher, B. und Biemer, E. (2005). "Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model." *Br J Plast Surg* **58**(5): 695-701.
- Goldsmith, H. L. und Turitto, V. T. (1986). "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* **55**(3): 415-435.
- Gordon, L., Levinsohn, D. G., Borowsky, C. D., Manojlovic, R. D., Sessler, D. I., Weiner, M. W. und Baker, A. J. (1992). "Improved preservation of skeletal muscle in amputated limbs using pulsatile hypothermic perfusion with University of Wisconsin solution. A preliminary study." *J Bone Joint Surg Am* **74**(9): 1358-1366.
- Gravante, G., Ong, S. L., Metcalfe, M. S., Sorge, R., Bikhchandani, J., Lloyd, D. M. und Dennison, A. R. (2010). "Effects of hypoxia due to isovolemic hemodilution on an ex vivo normothermic perfused liver model." *J Surg Res* **160**(1): 73-80.
- Greaney, P. J., Jr., Cordisco, M., Rodriguez, D., Newberger, J., Legatt, A. D. und Garfein, E. S. (2010). "Use of an extracorporeal membrane oxygenation circuit as a bridge to salvage a major upper-extremity replant in a critically ill patient." *Journal of reconstructive microsurgery* **26**(8): 517-522.
- Hanasono, M. M., Barnea, Y. und Skoracki, R. J. (2009). "Microvascular surgery in the previously operated and irradiated neck." *Microsurgery* **29**(1): 1-7.
- Hansen, S. L., Foster, R. D., Dosanjh, A. S., Mathes, S. J., Hoffman, W. Y. und Leon, P. (2007). "Superficial temporal artery and vein as recipient vessels for facial and scalp microsurgical reconstruction." *Plast Reconstr Surg* **120**(7): 1879-1884.
- Harris, J. R., Lueg, E., Genden, E. und Urken, M. L. (2002). "The thoracoacromial/cephalic vascular system for microvascular anastomoses in the vessel-depleted neck." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**(3): 319-323.
- Hassanein, W. H., Zellos, L., Tyrrell, T. A., Healey, N. A., Crittenden, M. D., Birjiniuk, V. und Khuri, S. F. (1998). "Continuous perfusion of donor hearts in the beating state extends preservation time and improves recovery of function." *J Thorac Cardiovasc Surg* **116**(5): 821-830.
- Haubner, F., Ohmann, E., Pohl, F., Strutz, J. und Gassner, H. G. (2012). "Wound healing after radiation therapy: review of the literature." *Radiat Oncol* **7**: 162.
- Hayden, R. E. und Nagel, T. H. (2013). "The evolving role of free flaps and pedicled flaps in head and neck reconstruction." *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **21**(4): 305-310.

- Head, C., Sercarz, J. A., Abemayor, E., Calcaterra, T. C., Rawnsley, J. D. und Blackwell, K. E. (2002). "Microvascular reconstruction after previous neck dissection." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(3): 328-331.
- Heinzeller, T. und Büsing, C. M. (2001). *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. Stuttgart, New York, Thieme.
- Herold, C., Reimers, K., Allmeling, C., Rennekampff, H. O. und Vogt, P. M. (2009). "A normothermic perfusion bioreactor to preserve viability of rat groin flaps extracorporally." Transplant Proc **41**(10): 4382-4388.
- Hicks, T. E., Boswick, J. A., Jr. und Solomons, C. C. (1980). "The effects of perfusion on an amputated extremity." J Trauma **20**(8): 632-648.
- Hiebert, L. M. und Jaques, L. B. (1976). "The observation of heparin on endothelium after injection." Thromb Res **8**(2): 195-204.
- Hiebert, L. M. und Liu, J. M. (1990). "Heparin protects cultured arterial endothelial cells from damage by toxic oxygen metabolites." Atherosclerosis **83**(1): 47-51.
- Holm, C., Dornseifer, U., Sturtz, G. und Ninkovic, M. (2010). "Sensitivity and specificity of ICG angiography in free flap reexploration." J Reconstr Microsurg **26**(5): 311-316.
- Hölzle, F., Hohlweg-Majert, B., Kesting, M. R., Mücke, T., Loeffelbein, D. J., Wolff, K. D. und Wysluch, A. (2009). "Reverse flow facial artery as recipient vessel for perforator flaps." Microsurgery **29**(6): 437-442.
- Hölzle, F., Loeffelbein, D. J., Nolte, D. und Wolff, K. D. (2006). "Free flap monitoring using simultaneous non-invasive laser Doppler flowmetry and tissue spectrophotometry." J Craniomaxillofac Surg **34**(1): 25-33.
- Hölzle, F., Rau, A., Loeffelbein, D. J., Mücke, T., Kesting, M. R. und Wolff, K. D. (2010). "Results of monitoring fasciocutaneous, myocutaneous, osteocutaneous and perforator flaps: 4-year experience with 166 cases." Int J Oral Maxillofac Surg **39**(1): 21-28.
- Hosgood, S. A. und Nicholson, M. L. (2011). "First in man renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion." Transplantation **92**(7): 735-738.
- Hosgood, S. A. und Nicholson, M. L. (2014). "The first clinical case of intermediate ex vivo normothermic perfusion in renal transplantation." Am J Transplant **14**(7): 1690-1692.
- J.-E. Hausamen, E. M., J. Reuther, H. E. und A. Kübler, H. S. (2012). *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Operationslehre und -atlas, 4., vollständig überarbeitete Auflage*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Jacobson, A. S., Eloy, J. A., Park, E., Roman, B. und Genden, E. M. (2008). "Vessel-depleted neck: techniques for achieving microvascular reconstruction." Head Neck **30**(2): 201-207.
- Janakiraman, K., Shenoy, S. und Sandhu, J. S. (2011). "Intravascular haemolysis during prolonged running on asphalt and natural grass in long and middle distance runners." J Sports Sci **29**(12): 1287-1292.
- Janis, J. E., Kwon, R. K. und Attinger, C. E. (2011). "The new reconstructive ladder: modifications to the traditional model." Plastic and reconstructive surgery **127** Suppl 1: 205S-212S.
- Kaiser, U., Mayer, B., Christoph, S. und Goetze, K. (1993). "Die Entwicklung eines leichten, automatisch gesteuerten Lappen-Containers zum Direkttransfer und zur warmen Langzeitkonservierung freier, mikrochirurgischer Lappen." European Archives of Oto-Rhino-Laryngology Suppl. **1993/II**: 276-277.
- Karle, W. E., Anand, S. M., Clain, J. B., Scherl, S., Buchbinder, D., Smith, M. L. und Urken, M. L. (2013). "Use of a combined latissimus dorsi scapular free flap revascularized with vein grafting to the internal mammary artery in a vessel-depleted and previously irradiated neck." Head Neck **35**(11): E328-332.
- Kato, G. J., McGowan, V., Machado, R. F., Little, J. A., Taylor, J. t., Morris, C. R., Nichols, J. S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, S. M., Jr. und Gladwin, M. T. (2006). "Lactate dehydrogenase as

- a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease." Blood **107**(6): 2279-2285.
- Kiener, J. L., Hoffman, W. Y. und Mathes, S. J. (1991). "Influence of radiotherapy on microvascular reconstruction in the head and neck region." Am J Surg **162**(4): 404-407.
- Kinetics Concepts Inc. (KCI), San Antonio, TX, United States. "Indikationen und Sicherheitshinweise für V.A.C.(R) Therapy." Zugriff erfolgt am 13.01.2015, auf <http://kci-medical.de/DE-GER/indikationen>.
- Klein, C. (2000). "[Experiences with an arterialized venous flap for intraoral defect reconstruction]." Zentralbl Chir **125**(1): 51-55.
- Klinke, R. und Silbernagel, S. (1996). Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Knox, R. D., Pratt, M. F., Adkins, W. Y. und Flick, J. T. (1989). "The use of pentoxifylline in a pig random skin flap model." Laryngoscope **99**(6 Pt 1): 582-585.
- Koshima, I. und Soeda, S. (1989). "Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle." Br J Plast Surg **42**(6): 645-648.
- Kour, A. K., Phone, M. H., Chia, J. und Pho, R. W. (1995). "A preliminary report of tissue preservation with University of Wisconsin cold storage solution in major limb replantation." Ann Acad Med Singapore **24**(4 Suppl): 37-41.
- Kovacs, A. F. (1998). "Comparison of two types of arterialized venous forearm flaps for oral reconstruction and proposal of a reliable procedure." J Craniomaxillofac Surg **26**(4): 249-254.
- Krijgh, D. D. und Mureau, M. A. (2013). "Reconstructive options in patients with late complications after surgery and radiotherapy for head and neck cancer: remember the deltopectoral flap." Ann Plast Surg **71**(2): 181-185.
- Krug, A. (2007). "Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung des Gewebes." Phlebologie **36**: 300-312.
- Kruse, A. L., Luebbers, H. T., Gratz, K. W. und Obwegeser, J. A. (2010). "Factors influencing survival of free-flap in reconstruction for cancer of the head and neck: a literature review." Microsurgery **30**(3): 242-248.
- Kruse, A. L., Luebbers, H. T., Obwegeser, J. A., Bredell, M. und Gratz, K. W. (2011). "Evaluation of the pectoralis major flap for reconstructive head and neck surgery." Head Neck Oncol **3**: 12.
- Kummoona, R. (2010). "Reconstruction by lateral cervical flap of perioral and oral cavity: clinical and experimental studies." J Craniofac Surg **21**(3): 660-665.
- Kupatt, C., Hinkel, R., Horstkotte, J., Deiss, M., von Bruhl, M. L., Bilzer, M. und Boekstegers, P. (2004). "Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model." Cardiovasc Res **61**(3): 530-537.
- Kuroda, Y., Fujino, Y., Morita, A., Tanioka, Y., Suzuki, Y., Kawamura, T., Ku, Y. und Saitoh, Y. (1992). "Successful 96-hour preservation of the canine pancreas." Transpl Int **5 Suppl 1**: S388-390.
- Lamberty, B. G. (1979). "The supra-clavicular axial patterned flap." Br J Plast Surg **32**(3): 207-212.
- Lane, R. J., Phillips, M., McMillan, D., Huckson, M., Liang, S. W. und Cuzzilla, M. (2008). "Hypertensive extracorporeal limb perfusion (HELP): a new technique for managing critical lower limb ischemia." J Vasc Surg **48**(5): 1156-1165; discussion 1165.
- Li, X., Cooley, B. C., Fowler, J. D. und Gould, J. S. (1995). "Intravascular heparin protects muscle flaps from ischemia/reperfusion injury." Microsurgery **16**(2): 90-93.
- Li, X., Cooley, B. C. und Gould, J. S. (1993). "Ex vivo perfusion with anticoagulated blood decreases ischemia/reperfusion injury." J Hand Surg Am **18**(4): 629-634.
- Likosky, D. S. (2009). "An epidemiologist's review of the case for pulsatile flow during cardiopulmonary bypass." J Extra Corpor Technol **41**(1): P30-32.

- Liu, P. H. und Chiu, E. S. (2009). "Supraclavicular artery flap: a new option for pharyngeal reconstruction." *Ann Plast Surg* **62**(5): 497-501.
- Loeffelbein, D. J. (2003). "Noninvasives Monitoring mikrovaskulärer Transplantate mit Hilfe der simultanen Laser-Doppler-Spektrometrie." Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Medizin". Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Knappschafts-Krankenhaus Bochum-Langendreer, Ruhr-Universität Bochum.
- Lorentz, K. (1995). "Einführung der neuen Standardmethoden 1994 zur Bestimmung der katalytischen Enzymkonzentration bei 37°C." *Klin Chem Mitt* **29**(5): 290-293.
- Lyons, A. und Ghazali, N. (2008). "Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment." *Br J Oral Maxillofac Surg* **46**(8): 653-660.
- Machens, H. G. (2008). "[The First Bilateral Arm Transplantation in the Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.]" *Handchir Mikrochir Plast Chir*: DOI 10.1055/s-2008-1038946.
- Maeda, M., Fukui, A., Inada, Y., Tamai, S. und Mizumoto, S. (1990). "Continuous local intraarterial infusion of antithrombotic agents for epigastric flap transfer in rabbit." *Journal of reconstructive microsurgery* **6**(3): 261-266.
- Maeda, M., Fukui, A., Tamai, S., Mii, Y. und Miura, S. (1993). "Extracorporeal circulation for tissue transplantation (in the case of venous flaps)." *Plastic and reconstructive surgery* **91**(1): 113-124; discussion 125-116.
- The Merck Manual Professional Edition (2013, September 2013). "Normal Laboratory Values: Blood, Plasma and Serum." Zugriff erfolgt am 02.11.2014, auf http://www.merckmanuals.com/professional/appendixes/normal_laboratory_values/blood_tests_normal_values.html.
- Marchand, A., Galen, R. S. und Van Lente, F. (1980). "The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease." *JAMA* **243**(19): 1909-1911.
- Matsumoto, S. und Kuroda, Y. (2002). "Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation." *Transplantation* **74**(12): 1804-1809.
- May, J. W., Jr., Chait, L. A., O'Brien, B. M. und Hurley, J. V. (1978). "The no-reflow phenomenon in experimental free flaps." *Plast Reconstr Surg* **61**(2): 256-267.
- Mayer, B. (1998). "Einsparung von Tierversuchen mit einem extrakorporalen Kreislaufsystem zur Vitalerhaltung von isolierten Gewebelöcken." *Der Tierschutzbeauftragte* **1**: 67-69.
- Mayer, B. (2002). "[Significance of extracorporally perfused microsurgical free flaps]." *Laryngorhinootologie* **81**(9): 640-643.
- Mayer, B., Gunzenhäuser, S. und Christoph, S. (1992a). "Wie konserviert und konditioniert man intraoperativ einen freien mikrochirurgischen Lappen?" *Laryngo-Rhino-Otologie* **71**: 653-654.
- Mayer, B. und Kaempfer, L. (1996). "Der freie mikrochirurgische obere muskulokutane Trapezius-Lappen des Schweins: Ein ideales Trainingsmodell für mikrovaskuläre Rekonstruktionen und ein In-vitro-Modell für die experimentelle Mikrochirurgie." *Laryngo-Rhino-Otologie* **75**: 175-177.
- Mayer, B., Kaier, U., Pundrich, C., de Veer, I., Lajous-Petter, A.-M. und Kaempfer, L. (1994). "Die Entwicklung eines autonomisch gesteuerten Lappencontainers zum Direkttransfer und zur warmen extrakorporalen Langzeitkonservierung freier, mikrochirurgischer Lappen, abgetrennter Extremitäten und isolierter Organe." *Oto-Rhino-Laryngologia Nova* **4**(4): 190-193.
- Mayer, B., von Baeyer, H. und Kaier, U. (1992b). "Warme Vitalkonservierung freier, mikrochirurgischer Lappen über ein extrakorporales Kreislaufsystem." *Oto-Rhino-Laryngologia Nova* **2**(4): 212-214.
- Mayer, B., von Baeyer, H. und Kaiser, U. (1993). "New dimensions for the vital storage of microsurgical free flaps: an experimental approach." *Otolaryngol Head Neck Surg* **109**(4): 690-692.
- Mayer, B., von Baeyer, H., Kaiser, U. und Stahl, K. (1992c). "Extrakorporales Kreislaufsystem für die warme Vitalkonservierung eines freien mikrochirurgischen Lappens." *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology Suppl* **1992/II**: 231-232.
- Mayer, B. A. (1992). "Cold preservation of microvascular free flaps." *Plast Reconstr Surg* **90**(6): 1122.

- McBride, C. M. (1970). "Perfusion treatment for malignant melanoma of the extremity." Arch Chir Neerl **22**(2): 91-95.
- McCraw, J. B., Dibbell, D. G. und Carraway, J. H. (1977). "Clinical definition of independent myocutaneous vascular territories." Plast Reconstr Surg **60**(3): 341-352.
- McGregor, I. A. (1963). "The Temporal Flap in Intra-Oral Cancer: Its Use in Repairing the Post-Excisional Defect." Br J Plast Surg **16**: 318-335.
- Mehl, R. L., Paul, H. A., Shorey, W. D., Schneewind, J. H. und Beattie, E. J., Jr. (1964). "Patency of the Microcirculation in the Traumatically Amputated Limb--a Comparison of Common Perfusates." J Trauma **4**: 495-505.
- Miller, M. J., Schusterman, M. A., Reece, G. P. und Kroll, S. S. (1993). "Interposition vein grafting in head and neck reconstructive microsurgery." J Reconstr Microsurg **9**(3): 245-251; discussion 251-242.
- Momeni, A., Kim, R. Y., Kattan, A., Tennefoss, J., Lee, T. H. und Lee, G. K. (2011). "The effect of preoperative radiotherapy on complication rate after microsurgical head and neck reconstruction." J Plast Reconstr Aesthet Surg **64**(11): 1454-1459.
- Moscoso, J. F., Urken, M. L., Dalton, J., Wesson, M. F. und Biller, H. F. (1994). "Simultaneous interstitial radiotherapy with regional or free-flap reconstruction, following salvage surgery of recurrent head and neck carcinoma. Analysis of complications." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **120**(9): 965-972.
- Mücke, T. (2012). "Evaluation der Indocyanin-Grün Videoangiographie zur Validierung der Anwendung auf mikrovaskuläre Prozeduren im Rattenmodell." Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Zahnheilkunde". Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Technische Universität München.
- Mücke, T. (2013). "Klinische und tierexperimentelle Ergebnisse zur Beurteilung der Perfusion und Erfolgsraten nach mikrochirurgischem Gewebetransfer." Kumulative Habilitationsschrift zur Erlangung des Titels "Privatdozent". Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität München.
- Mücke, T., Borgmann, A., Fichter, A. M., Wagenpfeil, S., Mitchell, D. A., Ritschl, L. M., Kesting, M. R. und Wolff, K. D. (2013). "The influence of different VEGF administration protocols on the perfusion of epigastric flaps in rats." Br J Oral Maxillofac Surg **51**(6): 555-562.
- Mücke, T., Borgmann, A., Wagenpfeil, S., Gunzinger, R., Nobauer, C., Lange, R., Slotta-Huspenina, J., Hölzle, F. und Wolff, K. D. (2011). "Autonomization of epigastric flaps in rats." Microsurgery.
- Mücke, T., Koschinski, J., Wagenpfeil, S., Wolff, K. D., Kanatas, A., Mitchell, D. A., Deppe, H. und Kesting, M. R. (2012a). "Functional outcome after different oncological interventions in head and neck cancer patients." J Cancer Res Clin Oncol **138**(3): 371-376.
- Mücke, T., Rau, A., Weitz, J., Ljubic, A., Rohleder, N., Wolff, K. D., Mitchell, D. A. und Kesting, M. R. (2012b). "Influence of irradiation and oncologic surgery on head and neck microsurgical reconstructions." Oral Oncol **48**(4): 367-371.
- Mücke, T., Wolff, K. D., Rau, A., Kehl, V., Mitchell, D. A. und Steiner, T. (2012). "Autonomization of free flaps in the oral cavity: A prospective clinical study." Microsurgery **32**(3): 201-206.
- Mücke, T., Wolff, K. D., Wagenpfeil, S., Hölzle, F. und Scholz, M. (2010a). "Reliability of near-infrared angiography and micro-Doppler sonography for evaluating microvascular anastomoses." Plast Reconstr Surg **126**(5): 1506-1514.
- Mücke, T., Wolff, K. D., Wagenpfeil, S., Mitchell, D. A. und Hölzle, F. (2010b). "Immediate microsurgical reconstruction after tumor ablation predicts survival among patients with head and neck carcinoma." Ann Surg Oncol **17**(1): 287-295.
- Muller, S., Constantinescu, M. A., Kiermeir, D. M., Gajanayake, T., Bongoni, A. K., Vollbach, F. H., Meoli, M., Plock, J., Jenni, H., Banic, A., Rieben, R. und Vogelín, E. (2013). "Ischemia/reperfusion injury of porcine limbs after extracorporeal perfusion." J Surg Res **181**(1): 170-182.

- Mumme, A., Kemen, M., Ernst, R. und Zumtobel, V. (1991). "[Locoregional ultrahigh dosage fibrinolysis of deep leg vein thrombosis]." *Vasa Suppl* **33**: 122-123.
- Muramatsu, I., Takahata, N., Usui, M. und Ishii, S. (1985). "Metabolic and histologic changes in the ischemic muscles of replanted dog legs." *Clin Orthop Relat Res*(196): 292-299.
- Namdar, T., Bartscher, T., Stollwerck, P. L., Mailander, P. und Lange, T. (2010). "Complete free flap loss due to extensive hemodilution." *Microsurgery* **30**(3): 214-217.
- Nicholson, M. L. und Hosgood, S. A. (2013). "Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study." *Am J Transplant* **13**(5): 1246-1252.
- Nicolini, F., Agostinelli, A., Spaggiari, I., Vezzani, A., Benassi, F., Maestri, F. und Gherli, T. (2014). "Current trends in surgical revascularization of multivessel coronary artery disease with arterial grafts." *Int Heart J* **55**(5): 381-385.
- Ninkovic, M., Anderl, H., Hefel, L., Schwabegger, A. und Wechselberger, G. (1995). "Internal mammary vessels: a reliable recipient system for free flaps in breast reconstruction." *Br J Plast Surg* **48**(8): 533-539.
- Nogueira, A. C., Wagner, S., Riebeling, I. I. und Klug, S. (1999). "[The isolated normothermic hemoperfused porcine leg as model for pharmacological and toxicological investigations]." *ALTEX* **16**(2): 90-94.
- Norden, M. A., Rao, V. K. und Southard, J. H. (1997). "Improved preservation of rat hindlimbs with the University of Wisconsin solution and butanedione monoxime." *Plast Reconstr Surg* **100**(4): 957-965.
- O'Donovan, M. J., Rowlerson, A. und Taylor, A. (1976). "Proceedings: The perfused isolated human limb: an assessment of its viability." *J Physiol* **256**(1): 27P-28P.
- Oesterwitz, H., Ghods, M. und Geomelas, M. (2014). *Praktische Mikrochirurgie, Anwendungen in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie und der Urologie*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Palm, H. G., Hauer, T., Simon, C. und Willy, C. (2011). "[Vacuum-assisted closure of head and neck wounds]." *HNO* **59**(8): 819-830.
- Pepper, J. P. und Baker, S. R. (2013). "Local flaps: cheek and lip reconstruction." *JAMA Facial Plast Surg* **15**(5): 374-382.
- Petruzzo, P., Testelin, S., Kanitakis, J., Badet, L., Lengele, B., Girbon, J. P., Parmentier, H., Malcus, C., Morelon, E., Devauchelle, B. und Dubernard, J. M. (2012). "First human face transplantation: 5 years outcomes." *Transplantation* **93**(2): 236-240.
- Pirgousis, P. und Fernandes, R. (2011). "Use of the internal mammary artery perforator flap for repair of pharyngocutaneous fistulas in the vessel-depleted neck." *J Oral Maxillofac Surg* **69**(4): 1225-1228.
- Quilichini, J., Benjoar, M. D., Hivelin, M., Brugel, L. und Lantieri, L. (2012). "Semi-free radial forearm flap for head and neck reconstruction in vessel-depleted neck after radiotherapy or radical neck dissection." *Microsurgery* **32**(4): 269-274.
- Quillen, C. G., Shearin, J. C., Jr. und Georgiade, N. G. (1978). "Use of the latissimus dorsi myocutaneous island flap for reconstruction in the head and neck area: case report." *Plast Reconstr Surg* **62**(1): 113-117.
- Quinones-Baldrich, W. J., Colburn, M. D., Gelabert, H. A., Barcliff, L. T. und Moore, W. S. (1994). "Isolated limb thrombolysis with extracorporeal pump and urokinase." *J Surg Res* **57**(3): 344-351.
- Rasband, W. S. (1997-2009). *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Robitzky, L. K. (2015). "Die Applikation verschiedener Antikoagulanzen und deren Einfluss auf das Überleben von Gewebetransplantaten im Rattenmodell." Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Medizin". Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Technische Universität München. Stand: Dissertation bei der Fakultät eingereicht.

- Rojas-Pena, A., Reoma, J. L., Krause, E., Boothman, E. L., Padiyar, N. P., Cook, K. E., Bartlett, R. H. und Punch, J. D. (2010). "Extracorporeal support: improves donor renal graft function after cardiac death." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **10**(6): 1365-1374.
- Rosen, H. M., Slivjak, M. J. und McBrearty, F. X. (1985). "Preischemic flap washout and its effect on the no-reflow phenomenon." Plast Reconstr Surg **76**(5): 737-747.
- Rosen, H. M., Slivjak, M. J. und McBrearty, F. X. (1987). "The role of perfusion washout in limb revascularization procedures." Plast Reconstr Surg **80**(4): 595-605.
- Rudolph, R., Arganese, T. und Woodward, M. (1982). "The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin." Ann Plast Surg **9**(4): 282-292.
- Safak, T. und Akyurek, M. (2001). "Cephalic vein-pedicled arterialized anteromedial arm venous flap for head and neck reconstruction." Ann Plast Surg **47**(4): 446-449.
- Sakuraba, M., Miyamoto, S., Kimata, Y., Nakatsuka, T., Harii, K., Ebihara, S. und Hayashi, R. (2013). "Recent advances in reconstructive surgery: head and neck reconstruction." Int J Clin Oncol **18**(4): 561-565.
- Salgarello, M., Snider, F., Finocchi, V., Bussu, F., Paludetti, G. und Almadori, G. (2011). "The Pruitt-Inahara carotid shunt as an assisting tool to anastomose the arterial free flap pedicle to the internal carotid artery in the vessel-depleted neck." Microsurgery **31**(3): 234-236.
- Sanders, R. und Mayou, B. J. (1979). "A new vascularized bone graft transferred by microvascular anastomosis as a free flap." Br J Surg **66**(11): 787-788.
- Sandu, K., Monnier, P. und Pasche, P. (2012). "Supraclavicular flap in head and neck reconstruction: experience in 50 consecutive patients." Eur Arch Otorhinolaryngol **269**(4): 1261-1267.
- Seidenberg, B., Rosenak, S. S., Hurwitz, E. S. und Som, M. L. (1959). "Immediate reconstruction of the cervical esophagus by a revascularized isolated jejunal segment." Ann Surg **149**(2): 162-171.
- Serafin, D., Shearin, J. C. und Georgiade, N. G. (1977). "The vascularization of free flaps: a clinical and experimental correlation." Plast Reconstr Surg **60**(2): 233-241.
- Shih, A. W., McFarlane, A. und Verhovsek, M. (2014). "Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation." Am J Hematol **89**(4): 443-447.
- Shimizu, F., Lin, M. P., Ellabban, M., Evans, G. R. und Cheng, M. H. (2009). "Superficial temporal vessels as a reserve recipient site for microvascular head and neck reconstruction in vessel-depleted neck." Ann Plast Surg **62**(2): 134-138.
- Silverberg, B., Banis, J. C., Jr. und Acland, R. D. (1985). "Mandibular reconstruction with microvascular bone transfer. Series of 10 patients." Am J Surg **150**(4): 440-446.
- Simpson, K. H., Murphy, P. G., Hopkins, P. M. und Batchelor, A. G. (1996). "Prediction of outcomes in 150 patients having microvascular free tissue transfers to the head and neck." Br J Plast Surg **49**(5): 267-273.
- Song, Y. G., Chen, G. Z. und Song, Y. L. (1984). "The free thigh flap: a new free flap concept based on the septocutaneous artery." Br J Plast Surg **37**(2): 149-159.
- Soutar, D. S., Scheker, L. R., Tanner, N. S. und McGregor, I. A. (1983). "The radial forearm flap: a versatile method for intra-oral reconstruction." Br J Plast Surg **36**(1): 1-8.
- Southard, J. H. und Belzer, F. O. (1995). "Organ preservation." Annu Rev Med **46**: 235-247.
- Strauch, B. und Murray, D. E. (1967). "Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm. in external diameter using microsurgical techniques." Plast Reconstr Surg **40**(4): 325-329.
- Striebel, H. W. (2012). Anästhesie - Intensivmedizin - Notfallmedizin, Schattauer GmbH.
- Sturtz, G., Heidekruger, P. I. und Ninkovic, M. (2012). "[The internal thoracic vessels as alternative recipient vessels for microsurgical reconstruction in the head and neck area in patients with a vessel-depleted neck]." Handchir Mikrochir Plast Chir **44**(2): 75-79.

- Su, T., Pirgousis, P. und Fernandes, R. (2013). "Versatility of supraclavicular artery island flap in head and neck reconstruction of vessel-depleted and difficult necks." *J Oral Maxillofac Surg* **71**(3): 622-627.
- Suedkamp, M., Lercher, A. J., Mueller-Riemenschneider, F., LaRosee, K., Tossios, P. und Mehlhorn, U. (2004). "Hemolysis parameters of St. Jude Medical: Hemodynamic Plus and Regent valves in aortic position." *Int J Cardiol* **95**(1): 89-93.
- Suh, J. D., Sercarz, J. A., Abemayor, E., Calcaterra, T. C., Rawnsley, J. D., Alam, D. und Blackwell, K. E. (2004). "Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**(8): 962-966.
- Sundaram, S., Courtney, J. M., Taggart, D. P., Tweddel, A. C., Martin, W., McQuiston, A. M., Wheatley, D. J. und Lowe, G. D. (1994). "Biocompatibility of cardiopulmonary bypass: influence on blood compatibility of device type, mode of blood flow and duration of application." *Int J Artif Organs* **17**(2): 118-128.
- Swanson, E. W., Brandacher, G. und Gordon, C. R. (2014). "Discussion of lessons learned from the first quadruple extremity transplantation in the world: comments and concerns regarding quadruple extremity allotransplantation." *Ann Plast Surg* **73**(3): 343-345.
- Szudek, J. und Taylor, S. M. (2007). "Systematic review of the platysma myocutaneous flap for head and neck reconstruction." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **133**(7): 655-661.
- Taeger, C. D., Muller-Seubert, W., Horch, R. E., Prabst, K., Munch, F., Geppert, C. I., Birkholz, T. und Dragu, A. (2014). "Ischaemia-related cell damage in extracorporeal preserved tissue - new findings with a novel perfusion model." *J Cell Mol Med* **18**(5): 885-894.
- Tagliacozzi, G. (1597). *De Curtorum Chirurgia per Insitionem: Libri Duo*. Venice.
- Tall, J., Bjorklund, T. C., Skogh, A. C., Arnander, C. und Halle, M. (2014). "Vascular Complications After Radiotherapy in Head and Neck Free Flap Reconstruction: Clinical Outcome Related to Vascular Biology." *Ann Plast Surg*.
- Tamas, R., Nemeth, N., Brath, E., Sasvari, M., Nyakas, C., Debreczeni, B., Miko, I. und Furka, I. (2010). "Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model." *Microsurgery* **30**(4): 282-288.
- Tang, W. R., Varkey, P., Giroto, R., Tan, N. C., Rose, V. und Chen, H. C. (2008). "The venous flap - a safe alternative to the simple vein graft in a special situation." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **61**(4): 434-437.
- Taylor, G. I. und Watson, N. (1978). "One-stage repair of compound leg defects with free, revascularized flaps of groin skin and iliac bone." *Plast Reconstr Surg* **61**(4): 494-506.
- Teo, K. G., Rozen, W. M. und Acosta, R. (2013). "The pectoralis major myocutaneous flap." *J Reconstr Microsurg* **29**(7): 449-456.
- Thein, E., Sevilimis, G., Muenzing, S., Hammer, C. und Messmer, K. (2001). "Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs." *Xenotransplantation* **8**(2): 94-99.
- Topalan, M., Bilgin-Karabulut, A. und Ermis, I. (2002). ""Extracorporeal loop" (blind loop): an alternative microsurgical technique for prelaminated flap transfer." *J Reconstr Microsurg* **18**(3): 155-158; discussion 159.
- Tsuchida, T., Kato, T., Yamaga, M., Ikebe, K., Oniki, Y., Irie, H. und Takagi, K. (2001). "Effect of perfusion during ischemia on skeletal muscle." *J Surg Res* **101**(2): 238-241.
- Tsuchida, T., Kato, T., Yamaga, M., Ikebe, K., Oniki, Y., Irie, H. und Takagi, K. (2003). "The effect of perfusion with UW solution on the skeletal muscle and vascular endothelial exocrine function in rat hindlimbs." *J Surg Res* **110**(1): 266-271.
- Usui, M., Ishii, S. und Muramatsu, I. (1983). "An experimental study on the effect of fluorocarbon on the preservation of free skin flaps in the rabbit." *Clin Orthop Relat Res*(175): 273-279.
- Usui, M., Ishii, S., Muramatsu, I. und Takahata, N. (1978). "An experimental study on "replantation toxemia". The effect of hypothermia on an amputated limb." *J Hand Surg Am* **3**(6): 589-596.

- Usui, M., Sakata, H. und Ishii, S. (1985). "Effect of fluorocarbon perfusion upon the preservation of amputated limbs. An experimental study." J Bone Joint Surg Br **67**(3): 473-477.
- Van Ginkel, R. J., Hoekstra, H. J., Meutstege, F. J., Oosterhuis, J. W., Uges, D. R. und Schraffordt Koops, H. (1995). "Hyperthermic isolated regional perfusion with cisplatin in the local treatment of spontaneous canine osteosarcoma: assessment of short-term effects." J Surg Oncol **59**(3): 169-176.
- Van Ginkel, R. J., Van Berlo, C. L., Baas, P. C., Koops, H. S., Stuling, R. V., Elstrodt, J. und Hoekstra, H. J. (1999). "Hyperthermic Isolated Limb Perfusion with TNF alpha and Cisplatin in the Treatment of Osteosarcoma of the Extremities: A Feasibility Study in Healthy Dogs." Sarcoma **3**(2): 89-94.
- Vasilakis, V., Patel, H. D. und Chen, H. C. (2009). "Head and neck reconstruction using cephalic vein transposition in the vessel-depleted neck." Microsurgery **29**(8): 598-602.
- Verschuur, H. P., Dassonville, O., Santini, J., Vallicioni, J., Poissonnet, G., Laudoyer, Y. und Demard, F. (1998). "Complications of the myocutaneous platysma flap in intraoral reconstruction." Head Neck **20**(7): 623-629.
- Villaret, D. B. und Futran, N. A. (2003). "The indications and outcomes in the use of osteocutaneous radial forearm free flap." Head Neck **25**(6): 475-481.
- Wagner, S. M., Nogueira, A. C., Paul, M., Heydeck, D., Klug, S. und Christ, B. (2003). "The isolated normothermic hemoperfused porcine forelimb as a test system for transdermal absorption studies." J Artif Organs **6**(3): 183-191.
- Wang, W. Z., Anderson, G., Maldonado, C. und Barker, J. (1996). "Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle." Microsurgery **17**(6): 324-329.
- Wentscher, J. (1903). "Ein weiterer Beitrag zur Überlebensfähigkeit der menschlichen Epidermiszellen." Dtsch Z Chir **70**: 21-44.
- Wikipedia (2014). "Ultrasonic flow meter." Zugriff erfolgt am 26.10.2014, auf http://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic_flow_meter.
- Wolfensohn, S. und Lloyd, M. (2003). Handbook of Laboratory Animal - Management and Welfare. Oxford, United Kingdom, Blackwell Publishing Ltd.
- Wolff, K.-D. und Hölzle, F. (2011). Raising of Microvascular Flaps - A Systemic Approach. Berlin Heidelberg New York, Springer.
- Wolff, K. D., Fichter, A., Braun, C., Bauer, F. und Humbs, M. (2014). "Flap raising on pulsatile perfused cadaveric tissue: A novel method for surgical teaching and exercise." J Craniomaxillofac Surg.
- Wolff, K. D., Hölzle, F. und Eufinger, H. (2003). "The radial forearm flap as a carrier for the osteocutaneous fibula graft in mandibular reconstruction." Int J Oral Maxillofac Surg **32**(6): 614-618.
- Wolff, K. D., Hölzle, F., Wysluch, A., Mücke, T. und Kesting, M. (2008). "Incidence and time of intraoperative vascular complications in head and neck microsurgery." Microsurgery **28**(3): 143-146.
- Wolff, K. D., Mücke, T., Lehmbruck, J., Loeffelbein, D. J., Kesting, M. R. und Hölzle, F. (2009). "Rapid autonomisation of a combined fibular- and anterolateral thigh flap transferred by a wrist carrier to an irradiated and vessel depleted neck." J Surg Oncol **99**(2): 123-126.
- Wolff, K. D., Uekermann, B., Matthes, G. und Wartenberg, E. (1998). "Intracapillary haemoglobin oxygenation and interstitial pO₂ in venous flaps: an experimental study in rats." Microsurgery **18**(5): 324-330.
- Wong, K. K., Higgins, K. M. und Enepekides, D. J. (2010). "Microvascular reconstruction in the vessel-depleted neck." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **18**(4): 223-226.
- Wong, L., Im, M. J. und Hoopes, J. E. (1991). "Increased survival of island skin flaps by systemic heparin in rats." Ann Plast Surg **26**(3): 221-226.

- Worner, M., Poore, S., Tilkorn, D., Lokmic, Z. und Penington, A. J. (2014). "A low-cost, small volume circuit for autologous blood normothermic perfusion of rabbit organs." Artif Organs **38**(4): 352-361.
- Yabe, Y., Ishiguro, N., Shimizu, T., Tamura, Y., Wakabayashi, T. und Miura, T. (1994). "Morphologic and metabolic study of the effect of oxygenated perfluorochemical perfusion on amputated rabbit limbs." J Reconstr Microsurg **10**(3): 185-191.
- Yang, G. F., Chen, P. J., Gao, Y. Z., Liu, X. Y., Li, J., Jiang, S. X. und He, S. P. (1997). "Forearm free skin flap transplantation: a report of 56 cases. 1981." Br J Plast Surg **50**(3): 162-165.
- Yland, M. J., Todo, S., Zhu, Y., Suzuki, T., Hamada, N., Zhang, S., Subbotin, V. M., Takeyoshi, I., Doria, C., Hikida, S., Nemoto, A., Venkataramanan, R., Tata, P. und Bernardo, J. F. (1996). "An automated and portable low-flow pulsatile perfusion system for organ preservation." Transpl Int **9**(6): 535-540.
- Yoshimura, H. und Djerassi, I. (1962). "Blood coagulation and vascular integrity: effects of heparin." Blood **20**: 602-608.
- Zbar, R. I., Funk, G. F., McCulloch, T. M., Graham, S. M. und Hoffman, H. T. (1997). "Pectoralis major myofascial flap: a valuable tool in contemporary head and neck reconstruction." Head Neck **19**(5): 412-418.
- Zur, B. (2005). "Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse." Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Medizin". Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Tabelle 3.8: Blutgasanalyse und laborchemische Untersuchungen

Zeit	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5	2,75	3	3,25	3,5	3,75	4	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6
MW	7,466	7,472	7,467	7,456	7,453	7,453	7,429	7,420	7,411	7,406	7,404	7,394	7,386	7,383	7,376	7,377	7,375	
SD	0,032	0,035	0,028	0,019	0,027	0,020	0,024	0,026	0,027	0,032	0,040	0,045	0,047	0,046	0,045	0,044	0,042	
Med	7,464	7,474	7,468	7,462	7,449	7,455	7,432	7,426	7,406	7,390	7,388	7,377	7,370	7,373	7,365	7,365	7,363	
Min	7,420	7,430	7,430	7,420	7,425	7,415	7,385	7,380	7,377	7,375	7,369	7,368	7,359	7,350	7,342	7,341	7,338	
Max	7,510	7,515	7,510	7,475	7,500	7,480	7,461	7,450	7,460	7,470	7,490	7,500	7,498	7,490	7,480	7,471	7,458	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
MW	14,1	11,8	11,0	10,6	9,9	8,6	8,5	8,7	8,5	8,0	7,9	8,6	7,0	6,6	5,9	5,1	5,0	
SD	3,2	2,3	2,3	2,0	2,0	2,6	2,4	1,6	1,5	1,4	1,4	3,8	2,0	1,7	1,6	1,5	1,6	
Med	13,4	11,1	10,9	10,8	10,4	8,5	9,6	9,3	8,9	8,4	8,2	7,4	6,8	6,3	5,8	4,9	5,1	
Min	10,8	9,4	7,2	7,6	7,4	4,3	3,4	5,8	6,3	6,2	5,7	4,9	4,3	3,9	3,2	2,5	2,4	
Max	18,6	15,5	14,0	14,3	13,2	12,5	10,8	10,4	10,1	9,9	9,7	16,7	10,9	9,6	8,4	7,1	6,5	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
MW	-9,2	-10,2	-11,9	-11,3	-12,0	-12,4	-12,7	-14,4	-14,1	-15,1	-15,5	-15,1	-14,5	-16,2	-16,4	-17,0	-18,0	
SD	2,7	2,2	2,7	2,0	1,6	1,3	1,9	1,1	1,7	1,4	1,3	1,7	2,5	1,7	2,3	1,9	0,3	
Med	-10,3	-10,9	-12,1	-11,5	-12,5	-12,5	-12,6	-14,4	-13,9	-14,9	-15,4	-15,5	-14,1	-16,3	-17,7	-17,9	-18,2	
Min	-11,6	-12,7	-14,9	-12,9	-13,4	-13,9	-15,6	-15,8	-15,9	-16,8	-17,2	-17,1	-17,8	-18,2	-18,1	-18,4	-18,3	
Max	-4,5	-6,7	-7,9	-8,7	-9,6	-10,5	-10,1	-13,1	-11,6	-13,2	-13,9	-12,4	-11,1	-12,8	-12,5	-13,7	-17,6	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
MW	98,0	98,5	98,4	98,3	98,3	98,8	99,1	98,9	98,9	98,8	98,8	98,9	98,7	98,9	98,9	99,0	99,2	
SD	1,9	1,5	1,3	1,6	1,0	0,7	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,4	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4	
Med	98,7	99,0	98,7	98,7	98,6	98,9	99,1	99,1	98,9	98,8	98,9	98,9	98,8	99,2	99,1	98,9	99,3	
Min	93,4	95,0	95,4	94,3	96,2	97,5	97,8	98,0	97,7	98,2	98,0	98,1	97,5	98,0	98,1	98,6	98,4	
Max	99,4	99,5	99,3	99,3	99,2	99,8	99,8	99,6	99,3	99,3	99,7	99,4	99,4	99,2	99,3	99,7	99,7	

Zeit	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5	2,75	3	3,25	3,5	3,75	4	
pO₂	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6
	MW	118,2	124,9	111,3	117,5	121,3	140,3	140,6	127,1	128,7	128,8	135,5	129,3	130,0	134,5	133,1	130,9	141,8
	SD	28,7	34,7	34,5	30,2	27,8	54,1	42,8	27,0	26,2	21,0	22,1	17,0	19,6	20,4	24,6	19,7	30,0
	Med	118,9	132,7	111,3	114,9	117,9	127,5	135,3	130,7	136,1	125,1	133,2	128,8	133,8	128,3	125,9	120,4	131,7
	Min	63,6	66,7	64,3	63,0	69,2	93,2	98,9	78,5	81,3	101,3	113,3	110,0	107,4	110,0	105,3	113,7	112,1
	Max	153,1	173,1	160,7	155,3	155,9	264,2	236,3	153,1	157,8	162,0	173,1	155,7	158,8	168,7	177,3	169,6	179,1
pCO₂	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
	MW	18,4	15,9	16,2	15,6	14,9	14,4	12,9	11,1	10,5	11,7	12,1	11,3	10,2	9,7	8,5	8,3	8,2
	SD	4,2	2,6	2,7	3,2	2,9	1,8	2,4	3,3	3,0	3,0	3,4	4,1	2,5	2,7	2,6	1,5	2,1
	Med	17,6	16,6	16,2	15,9	15,0	14,2	13,3	11,2	10,1	11,6	12,0	10,7	10,4	9,4	8,1	7,8	7,7
	Min	13,8	11,9	10,7	10,1	9,7	11,2	8,2	6,8	6,9	6,2	7,8	6,8	6,1	5,9	6,3	6,4	6,0
	Max	26,4	19,6	19,2	20,4	19,2	16,7	15,8	17,4	16,5	16,9	16,4	19,9	15,1	14,8	14,5	10,4	11,4
K⁺	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
	MW	4,37	4,53	4,44	4,58	4,41	4,78	5,03	4,82	4,87	4,89	5,27	4,78	5,00	5,30	5,44	5,52	5,59
	SD	0,63	0,52	0,50	0,60	0,53	0,56	0,73	0,47	0,55	0,49	0,58	0,59	0,66	0,68	0,55	0,66	0,70
	Med	4,34	4,53	4,56	4,38	4,35	4,76	5,00	4,81	4,70	4,76	5,34	4,61	4,81	5,27	5,39	5,71	5,61
	Min	3,54	3,33	3,39	3,44	3,80	3,69	4,00	4,14	4,24	4,30	4,25	4,07	4,20	4,42	4,60	4,72	4,76
	Max	5,21	5,10	4,89	5,02	5,02	5,63	6,45	5,50	5,61	5,64	5,91	5,80	6,15	5,91	6,02	6,36	6,50
Hb	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6
	MW	5,1	4,8	4,6	4,4	4,9	5,3	6,4	4,7	5,0	5,3	6,1	5,1	4,9	6,1	5,2	4,7	4,2
	SD	2,3	1,8	1,4	1,5	1,4	1,9	1,9	1,0	0,8	1,3	2,5	1,2	1,2	2,5	1,4	0,9	1,2
	Med	4,2	4,5	4,8	4,7	4,9	5,1	5,9	5,1	5,3	5,3	6,1	5,5	5,2	5,2	5,2	4,5	4,5
	Min	2,0	2,0	2,0	2,3	2,5	2,4	4,2	2,7	3,6	3,3	2,4	2,3	2,5	2,8	3,1	3,3	2,6
	Max	9,0	7,9	6,5	6,2	7,3	8,8	9,5	5,6	5,7	7,6	10,6	6,3	6,8	10,3	7,6	5,8	5,8

Blutgasanalyse und laborchemische Untersuchungen aus dem Perfusat während extrakorporaler Perfusion. Dargestellt sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median (Med), Minimum (Min) und Maximum (Max).

Tabelle 4.1: Literaturübersicht extrakorporale Gewebeperfusion

Autor	Modell ¹	Lappen ²	Gewebe ³	Anzahl ⁴	Kontrolle ⁵	Replantation	Oxygenator	Dialyse ⁶	Pum-	Pulsatiler Fluss	Hämolyse ⁸	Flussvolumen ⁹ [ml/min]	Druck ¹⁰ [mmHg]	Temperatur ¹¹ [°C]	Perfusat ¹²	ECP	Evaluation ¹³	Erkenntnisse	Probleme
DELOIRME <i>et al.</i> (1964)	M	Arm, Bein	OMC	k.A.	(+)	-	+	-	IP	-	n.u.	k.A.	k.A.	21	VB+ DEX	3,5	BGA, NS	ECP als Modell für Grundlagentuntersuchungen an amputierten Extremitäten	Ödeme, Erhöhung des peripheren Widerstands mit zunehmender Perfusionsdauer
Usui <i>et al.</i> (1985)	H	HL	OMC	5-9 (31)	+	(+)	+	+/-	k.A.	k.A.	n.u.	k.A.	36,8	0 21	FC-43, R	6	BGA, ME, Gew	Bei 21°C Perfusion mit FC der Kontrolle überlegen. Beste Ergebnisse mit FC bei 0°	Gewichtszunahme zwischen 29% (Fluosol) und 50% (Ringer). Muskelenzymanstieg
DOMINGO-PECH <i>et al.</i> (1991)	H	HL	OMC	6+9 (15)	(+)	(+)	+	+/-	Z	-	n.u.	500	>100	HT	VB+R	24	Gew, ME, LM	Weitgehend normale Muskelfaserstruktur nach 24-stündiger ECP	Metabolische Azidose Ödeme (20-50% Gewichtszunahme)
GORDON <i>et al.</i> (1992)	H	HL	OMC	6	+	-	+	+/-	k.A.	+	n.u.	var.	70	13	UW	12	ATP, ME, pH, MR, LM	ECP und Kühlung effektiver als nur Kühlung	Phosphokreatininanstieg nur in einem Fall Mikroembolisationen werden diskutiert
MAYER (1992)	S	FL	OMC	14-29	+	(1)	+	+	SP	-	+	k.A.	k.A.	21	MCDB	168	O2-Diff	Vitalerhalt über 168 Stunden möglich	mikrobielle Kontamination
MAEDA <i>et al.</i> (1993)	K	VF	FC	5 (50)	+	(10)	+	+/-	RP	-	n.u.	5	k.A.	21	HB, R, VB, P	36	Gew, BGA, Angio, LM	Tx freier Lappen ohne Gefäßanschluss möglich	Blutverlust (Vollblut), Ödeme, Nekrosen
YABE <i>et al.</i> (1994)	K	HL	OMC	k.A.	+	-	+	-	k.A.	k.A.	n.u.	0,0025 ml/g/min	k.A.	18	FV-43	6	BGA, ME, LM, EM	Schwellung endothelialer Zellen nach FC-Perfusion verringert, Beibehalt hoher ATP-Level	Mitochondriale Schwellung
MAYER <i>et al.</i> (1994)	S	TL	MC	1	-	+	+	+	k.A.	k.A.	n.u.	k.A.	k.A.	21	HAM	168	BGA, Metab, LM	Replantation nach 7-tägiger ECP im Einzelfall	mikrobielle Kontamination Probleme mit Einheilung der Hautkomponente
MAYER (2002)	S	TL	MC	6	-	-	+	+	k.A.	k.A.	n.u.	10-50	60-300	21	HAM	47-98	P, V, O2-Diff, LM	Ex vivo Vitalerhalt über mindestens 46h möglich	mikrobielle Kontamination

Autor	Modell ¹	Lappen ²	Gewebe ³	Anzahl ⁴	Kontrolle ⁵	Replantation	Oxygenator	Dialyse ⁶	Pum-	Pulsatiler Fluss	Hämolyse ⁸	Flussvolumen ⁹ [ml/min]	Druck ¹⁰ [mmHg]	Temperatur ¹¹ [°C]	Perfusat ¹²	ECP	Evaluation ¹³	Erkenntnisse	Probleme
HEROLD <i>et al.</i> (2009)	R	GF	A	6 (12)	+	-	-	-	SP	-	n.u.	2	k.A.	37	HAN, EC	240	LDH, LM	Ex vivo Vitalerhalt von Fettlappen den Kontrollen überlegen, Hannover'sche Lösung geeigneter als EC Lösung	LDH-Anstieg in allen Gruppen Eurocollins Lösung nicht geeignet
DRAGU <i>et al.</i> (2010)	S	RAF	M	5	-	-	-	-	IP	-	n.u.	10	var.	21	JS	2	LG, P	Stabile Perfusionsdrücke über 120 min	k.A.
CONSTANTINESCU <i>et al.</i> (2010)	S	FL	OMC	8	+	-	+	-	TP	-	n.u.	100–150	var. (MW 38,5)	32	VB	12	BGA, MAP, IF, LM, KD	Ex vivo Perfusion Kühlung überlegen. Aktionspotentiale auch nach 12 h noch ableitbar	Venöser Sog schädlich
GREANEY <i>et al.</i> (2010)	M	Arm	OMC	1	-	-	+	+	RP	-	n.u.	300	max. 250	34/–1	EK	72	MAP	Temporärer ex vivo Vitalerhalt eines Arms über 72h im Einzelfall	Infektion und Nekrosen (daher keine Replantation erfolgt)
DRAGU <i>et al.</i> (2012a)	S	RAF	M	5 (10)	-	+	-	-	IP	-	n.u.	10	var.	21	VB, JS	1	IH, P	Vollblut zeigte im Vergleich zu kristalloider Lösung keinen protektiven Einfluss (bei fehlender Oxygenation)	k.A.
DRAGU <i>et al.</i> (2012b)	S	RAF	M	5 (10)	-	-	-	-	IP	-	n.u.	100 (600 ml/h)	max. 1050 (140 kPa)	21	VB, JS	1	P, BGA O ₂ - im Gewebe	Zusätzliche Oxygenation notwendig Kristalloide Lösungen einfacher in der Anwendung	Blutverlust und Koagulation bei Verwendung von Vollblut Ödeme nach Verwendung von Jonosteril
MÜLLER <i>et al.</i> (2012)	S	FL	OMC	7–11 (32)	+	+	+	-	DP	+/-	n.u.	100–150	k.A.	32	VB + HES	6 12	BGA, Gew, KD, LM, IF, IA	ECP hat geringen Einfluss auf ischämie-/Reperfusionsschaden	Volumenverlust durch kapilläre Leckage, Prednisolon gegen kapilläre Leckage, Glukose, Insulin um Kalium und pH auszugleichen.
WORNER <i>et al.</i> (2014)	K	GF	A	7	-	-	+	+	PV+ RP	+	(+)	k.A.	k.A.	37	VB	120	LM	Perfusion in 4 von 7 epigastri-schen Lappen über 5 Tage möglich	Hämorrhagie, Perfusionsstopp

Autor	Modell ¹	Lappen ²	Gewebe ³	Anzahl ⁴	Kontrolle ⁵	Replantation	Oxygenator	Dialyse ⁶	Pum-	Pulsatiler Fluss	Hämolyse ⁸	Flussvolumen ⁹	Druck ¹⁰	Temperatur ¹¹	Perfusat ¹²	ECP	Evaluation ¹³	Erkenntnisse	Probleme
TAEGER <i>et al.</i> (2014)	S	RAF	M	5 (15)	+	(4)	-	+	IP	-	-	10	k.A.	21	HTK, JS	1	BGA, LM, IH	Perfusion oder einmalige Infusion mit HTK sind Perfusion oder Infusion mit kristalloiden Lösungen überlegen Oxygenation entscheidend, raumluft jedoch ausreichend	Ödeme
unser System	R	GF	FAC	8	+++ (3x8)	+	+	+/-	RP	-	+	2,2	max. 130	21	VB (+R +HES)	8	O2C, ICG, BGA, NR, LM	Temporärer Vitalerhalt über 8h mit anschließender Replantation	Hämolyse Ödeme Hämorrhagien

Geordnet nach Erscheinungsdatum der Veröffentlichung. Kurzzeitige händische Infusionen oder reine Auswaschungen wurden nicht berücksichtigt. Verwendete Abkürzungen: k.A. = keine Angabe, var. = variabel, n.u. = nicht untersucht, hep. = heparinisiert, ECP = extrakorporale Perfusion, EM = Elektronenmikroskop, n.u. = nicht untersucht. ¹ Verwendetes Modell: M= Mensch, H= Hund, S= Schwein, K= Kaninchen, R= Ratte. ² Verwendeter Lappen: HL= „hindlimb“, hintere Gliedmaßen, FL = „forelimb“, vordere Gliedmaßen, VF= Vorfuß, TL= Trapezius-Lappen, GF= „groin flap“, Leistenlappen, RAF= Rectus-abdominis-Lappen. ³ zusammengesetztes Gewebe: OMC= osteomyokutan, FC= fasziookutan, MC= myokutan, A= „adipos“, Fettlappen, M= reiner Muskellappen, FAC= faszio-adipo-kutan. ⁴ Stichprobengröße der ex vivo perfundierten Tiere, (Anzahl aller ex vivo perfundierten Tiere). Bei MAYER *et al.* (1992) wurden die „Vorfüße von 15 Schweinen“ verwendet. Bei einer Kontrolle (n=1) entspricht dies einer Stichprobengröße zwischen 14 und 29. Konkretere Aussagen fehlen. ⁵ Kontrolle: +- = Kontrollgruppe vorhanden, wenn angegeben Stichprobengröße der Kontrollgruppe in Klammern (in der Regel nicht perfundierte Lappen, bei MAYER *et al.* (1992) perfundierter aber nicht oxygenierter Lappen), n = Stichprobengröße pro Kontrollgruppe, +++ = drei Kontrollgruppen. ⁶ Dialyse: Bei Usui *et al.* (1985), DOMINIGO-PECH *et al.* (1991), GORDON *et al.* (1992) und bei uns erfolgte die Elimination von Metaboliten durch den Austausch des kompletten Perfusats nach vier Stunden. Bei MAEDA *et al.* (1993) erfolgt die venöse Drainage in den Körperkreislauf, wodurch sich eine Dialyse erbringt. ⁷ Verwendetes Pumpsystem: IP= Infusionspumpe, Z= Zentrifugalpumpe, SP= Schlauchpumpe, RP= Rollerpumpe, TP= Turbinenpumpe, Diagonalpumpe, PW+RP= pulsatile „pillow valve“ Pumpe und Rollerpumpe über 2 Kreisläufe. ⁸ Hämolyse: Da nur die Verwendung erythrozytenhaltiger Perfusate hämolytisch werden, werden nur Studien aufgeführt, die Vollblut oder Erythrozytenkonzentrate verwenden. (+) = „geringe“ Hämolyse nach Aussage der Autoren, n.u. = nicht untersucht. ⁹ Flussvolumen: bei DRAGU *et al.* (2012b) hat sich möglicherweise ein Fehler eingeschlichen. Während in allen anderen Studien der Arbeitsgruppe 10 ml/min als Flussvolumen angegeben sind, werden in dieser Veröffentlichung 600 ml/h, entsprechend 100 ml/min angegeben. Es ist davon auszugehen, dass 60 ml/h, also 10 ml/min gemeint sind. ¹⁰ Druck: Bei DRAGU *et al.* (2012b) hat sich möglicherweise ein weiterer Fehler eingeschlichen. Die maximalen Drücke wird mit 140 kPa, entspricht 1050 mmHg (!) angegeben. Es ist anzunehmen, dass 140 mmHg gemeint sind. ¹¹ Temperatur: GREANEY *et al.* (2010): Zunächst Perfusion bei 34°C, anschließend Abkühlung auf -4°C und weitere Perfusion für 72 Stunden. ¹² Perfusate: EK = Erythrozytenkonzentrat; UW = University of Wisconsin Lösung; EC = Eurocollin's Lösung; HAM = HAMS Keratinozytenkonzentrat; HTK = Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat, FC-43= Fluorcarbon Lösung, MCDB= MCDB-153 Keratinozytenkonzentrat, VB= Vollblut, JS= Jonosteril, HES= Hydroxyethylstärke, R= Ringer-Lösung. ¹³ Evaluationsmethoden: BGA= Blutgasanalyse, NAP= Nervenstimulation (Nervenaktionspotential), ME= Muskelenzyme, Gew= Lappengewicht, LM= Lichtmikroskopie, MR= Magnetresonanztomographie, O₂-Diff= Sauerstoffdifferenz, Angio= Angiographie, EM= Elektronenmikroskopie, Metab= Metabolite (Glukose, Laktat), P= Druck, V= Volumen, MAP= Muskelantwort (Muskelaktionspotential), IH= Immunhistologie, IA= Immunassay, IF= Immunfluoreszenz, NR= Nekroserate, ICG= Indocyanin-Grün Videoangiographie, O2C= Oxygen to see (Gewebesprektophotometrie), KD= Kompartimentdrücke.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen

Abb. 1.1: Die rekonstruktive Leiter	3
Abb. 1.2: Lokale und freie Lappen	5
Abb. 1.3: Gefäßverarmter Hals	9
Abb. 1.4: Mögliche Anschlussgefäße in der Kopf-Hals-Region	17
Abb. 1.5: Algorithmus zur Lokalisation möglicher Anschlussgefäße.....	18
Abb. 1.6: Extremitätenbasierte Lappen	26
Abb. 2.1. Perfusionssysteme zur Perfusion von Organen im Kleintiermodell	32
Abb. 2.2. Erstes Perfusionssystem im Einsatz.....	33
Abb. 2.3. Modifiziertes Perfusionssystem	36
Abb. 2.4: Funktionsweise einer Ultraschall-Flusssonde.....	37
Abb. 2.5: Zeitlicher Ablauf der Versuchsserie	42
Abb. 2.6 Funktionsweise der Gewebe-Photospektrometrie	45
Abb. 2.7: Funktionsweise Indocyanin-Grün Fluoreszenzangiographie	46
Abb. 2.8: Hebung des epigastrischen Lappens der Ratte.....	52
Abb. 2.9: Systematik des operativen Eingriffs, Schemazeichnung	54
Abb. 2.10: Operatives Vorgehen im Tiermodell	55
Abb. 3.1: Laktatdehydrogenaseaktivität und Laktat als Hämolyseparameter in der Ratte.....	66
Abb. 3.2: Laktatdehydrogenase und Haptoglobin als Hämolyseparameter beim Menschen.68	
Abb. 3.3: Klinischer Eindruck epigastrischer Lappen nach extrakorporaler Perfusion.....	71
Abb. 3.4: Klinischer Eindruck epigastrischen Lappen nach sieben Tagen	72
Abb. 3.5: Nekroserate	73
Abb. 3.6: Veränderung der Blutgase während extrakorporaler Perfusion.....	76
Abb. 3.7: Veränderung des Säure.Basehaushalts während extrakorporaler Perfusion.....	77
Abb. 3.8: Veränderung von pH-Wert und Kalium während extrakorporaler Perfusion.....	78

Abb. 3.9: Veränderung des Hämoglobingehalts während extrakorporaler Perfusion	79
Abb. 3.10: Sauerstoffsättigung im Gewebe während extrakorporaler Perfusion	81
Abb. 3.11: Hämoglobingehalt im Gewebe während extrakorporaler Perfusion	82
Abb. 3.12: Blutflussgeschwindigkeit im Gewebe während extrakorporaler Perfusion	83
Abb. 3.13: Blutflussvolumen im Gewebe während extrakorporaler Perfusion	84
Abb. 3.14: Sauerstoffsättigung und Blutflussvolumen.....	88
Abb. 3.14: Gewebe-photospektrometrische Ergebnisse (Boxplots).....	88
Abb. 3.15: Indocyanin-Grün Messung.....	90
Abb. 3.16: Prädikativer Wert der Indocyanin.Grün Fluoreszenzangiographie	91
Abb. 3.17: Indocyanin-Grün Videoanalyse.....	92
Abb. 3.18: Auswahl histologischer Bilder	93
Abb. 4.1: Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoffaffinität.....	119
Abb. 4.2: Steril montierbares Schlauchsystem	121
Abb. 4.3: Extrakorporal perfundierter Radialislapfen	135

Tabellen

Tabelle 3.1: Blutfluss durch femorale und epigastrische Gefäße der Ratte (ml/min).....	65
Tabelle 3.2: Deskriptive Statistik der BGA-Messungen von murinem Vollblut.....	67
Tabelle 3.3: Normwerte LDH und Haptoglobin	67
Tabelle 3.4: Statistik der Hämolyseparameter von humanem Vollblut.....	69
Tabelle 3.5: Prozentsatz nekrotischer Areale	74
Tabelle 3.6: Wichtige Laborparameter normaler Ratten	75
Tabelle 3.7: Statistische Auswertung der Blutgasanalyse	79
Tabelle 3.9: Statistik der gewebe-photospektrometrischen Daten	86
Tabelle 4.2: Alternative Einsatzgebiete der Extrakorporalen Gewebepfusion	132
Tabelle 3.8: Blutgasanalyse und laborchemische Untersuchungen	156
Tabelle 4.1: Literaturübersicht extrakorporale Gewebepfusion	158

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. WOLFF danke ich herzlich für die Überlassung dieses spannenden Themas und die gute Zusammenarbeit und das große Vertrauen, dass er mir in den vergangenen Jahren entgegen brachte.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Dr. T. MÜCKE für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und seine geduldige Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Frau Dr. A. BORGMANN, Herrn Dr. L. RITSCHL und Herrn L. SCHMIDT danke ich für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Gedankt sei auch Frau Dipl.-Stat. I.-C. RONDAK danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Herzlich sei auch den OP-Schwestern und Mitarbeitern des Tierbereichs am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung gedankt.

Herrn Prof. Dr. P. LUPPA und seinem Team danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Untersuchungen zur Hämolyse.

Gedankt sei auch den acht tapferen Blutspendern, die hier aus Datenschutzgründen namentlich nicht genannt werden dürfen.

Herrn Dipl.-Ing. M. HUMBS Ingenieur sei für die technische Umsetzung der Perfusionssysteme gedankt.

Meiner Familie und meiner Freundin Julia, die mir stets zur Seite standen danke ich für ihre Liebe und Unterstützung in allen Situationen.

