



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Analyse und Monitoring der Perfusion von dünnen Gewebetransplantaten
unter Berücksichtigung verschiedener Hebetekniken**

Anna Katharina Borgmann

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

Doktorin der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. Thomas Mücke

2. Prof. Dr. Hans-Günther Machens

Die Dissertation wurde am 10.06.2021 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.12.2021 angenommen.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Perforator flaps - how many perforators are necessary to keep a flap alive?

Fichter AM, Borgmann A, Ritschl LM, Mitchell DA, Wagenpfeil S, Dornseifer U, Wolff KD, Mücke T

Br J Oral Maxillofac Surg. 2014 May;52(5):432-7.

2. The influence of different VEGF administration protocols on the perfusion of epigastric flaps in rats

Mücke T, Borgmann A, Fichter AM, Wagenpfeil S, Mitchell DA, Ritschl LM, Kesting MR, Wolff KD.

Br J Oral Maxillofac Surg. 2013 Sep;51(6):555-62.

3. Autonomization of epigastric flaps in rats

Mücke T, Borgmann A, Wagenpfeil S, Günzinger R, Nöbauer C, Lange R, Slotta-Huspenina J, Hölzle F, Wolff KD.

Microsurgery. 2011 Sep;31(6):472-8.

Inhalt

1. Einleitung	- 7 -
1.1 Mikrochirurgischer Gewebetransfer.....	- 7 -
1.2. Gewebetransplantate	- 9 -
1.2.1 Mikrovaskuläre Transplantate.....	- 9 -
1.2.2 Perforatortransplantate	- 9 -
1.2.3 Lokale Hautlappenplastiken.....	- 11 -
1.2.3.1 Das Modell des axial pattern flap	- 11 -
1.2.3.2 Das Modell des random pattern flap.....	- 12 -
1.3 Transplantatmonitoring	- 12 -
1.4 VEGF und Angiogenese	- 14 -
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	- 16 -
2. Material und Methoden	- 18 -
2.1 Versuchsmodelle	- 18 -
2.1.1 Epigastrisches Transplantat	- 18 -
2.1.2 Perforatortransplantat.....	- 19 -
2.2 Studienaufbau.....	- 20 -
2.2.1 Versuchstiere und Haltung	- 20 -
2.2.3 Narkose.....	- 21 -
2.2.4 Operationen.....	- 22 -
2.2.4.1 Lappenbildung epigastrisches Hauttransplantat	- 22 -
2.2.4.2 Epigastrische Perforatorlappen	- 24 -
2.3 Bestimmung der Lappen- und Nekrosefläche	- 26 -
2.4 Applikation von VEGF.....	- 26 -
2.5 Technische Apparaturen	- 27 -
2.5.1 O2C.....	- 27 -
2.5.1.1 Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und der relativen Hämoglobinmenge.....	- 28 -
2.5.1.2 Bestimmung des Blutflusses und der Blutflussgeschwindigkeit	- 28 -
2.5.1.3 Ablauf der Messung	- 29 -
2.6 Histologische Untersuchungen.....	- 31 -
2.6.1 Gewebegewinnung.....	- 31 -
2.6.2. Immunhistochemie	- 31 -
2.6.2.1 CD31	- 31 -
2.6.2.2 von-Willebrand-Faktor.....	- 32 -

2.6.2.3 Verfahren	- 33 -
2.6.2.4 Formalin-Fixierung und Paraffin Einbettung	- 33 -
2.6.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	- 34 -
2.6.2.6 CD31-Färbung	- 34 -
2.6.2.7 Von-Willebrand-Faktor Färbung	- 35 -
2.7 Experimentelles Protokoll.....	- 37 -
2.7.1 Versuchsmodell.....	- 37 -
2.7.1.1 Gruppe I epigastrische Lappentransplantate	- 37 -
2.7.1.2 Gruppe I.v epigastrische Lappentransplantate und VEGF Applikation	- 39 -
2.7.1.3 Gruppe II Perforatorlappen.....	- 41 -
2.7.1.4 Gruppe II.v Perforatorlappen und VEGF Applikation	- 41 -
2.8 Auswertung und Statistik.....	- 43 -
3. Ergebnisse	- 44 -
3.1 Epigastrische Lappentransplantate	- 44 -
3.1.1 Flächenauswertung des epigastrischen Lappentransplantates abhängig vom Ligationszeitpunkt.....	- 44 -
3.1.2 Gruppe I - O2C Messung.....	- 45 -
3.1.3 Gruppe I - Histologische Untersuchung	- 50 -
3.2 Einfluss von VEGF auf epigastrische Lappentransplantate	- 51 -
3.2.1 Flächenauswertung der epigastrischen Lappentransplantate, abhängig vom Ligationszeitpunkt und dem VEGF-Applikationszeitpunkt	- 51 -
3.2.2. Gruppe I.v - O2C Messungen.....	- 53 -
3.2.3 Gruppe I.v - Histologische und immunhistologische Untersuchungen.....	- 55 -
3.3 Perforatortransplantate	- 59 -
3.3.1 Flächenauswertung der Perforatorengruppe abhängig von der Anzahl der Perforatoren	- 59 -
3.3.2 Perforatorengruppe - O2C Messungen.....	- 61 -
3.3.3 Perforatorengruppe - Histologische und immunhistologische Untersuchungen	- 63 -
3.3.4 Einfluss von VEGF auf Perforatortransplantate	- 64 -
3.3.4.1 Flächenauswertung der Perforatortransplantate abhängig von der Anzahl der Perforatoren und der VEGF Applikation.....	- 64 -
3.3.4.2 Perforatorgruppe mit VEGF - O2C Messungen	- 65 -
3.3.4.3 Perforatorgruppe mit VEGF - Histologische und Immunhistologische Untersuchungen	- 65 -
4. Diskussion	- 68 -
4.1. Autonomisationszeitpunkt	- 68 -
4.2 Perforatortransplantate	- 69 -

4.3 O2C	- 72 -
4.3.1 Die Anwendung von O2C	- 72 -
4.3.2 Messwerte O2C.....	- 73 -
4.4 VEGF.....	- 75 -
4.4.1 Applikationszeitpunkt.....	- 76 -
4.4.2 Perforatortransplantate und VEGF	- 77 -
5. Ausblick.....	- 78 -
6. Zusammenfassung.....	- 79 -
7. Literatur	- 81 -
8. Anhang	- 89 -
8.1 Abbildungsverzeichnis	- 89 -
8.2 Tabellenverzeichnis	- 91 -
9. Lebenslauf.....	- 92 -
10. Danksagung.....	- 93 -

Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CT	Computertomographie
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	dass heißt
et al.	und andere
EU	Europäische Union
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor
Hb	Hämoglobin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KGF	keratinocyte growth factor
KGW	Körpergewicht

kg	Kilogramm
µm	Mikrometer
M.	Musculus
max.	maximal
mg	Milligramm
min.	minimal
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MR	Magnetresonanz
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PDGF	platelet-derived growth factor
PIGF	placental growth factor
RT	Raumtemperatur
TGF	transforming growth factor
TBS	tris-buffered-saline
O ₂ C	Oxygen to see
o.g.	oben genannt
OP	Operation

ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
SO2	Sauerstoffsättigung
R.	Ramus
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
V.	Vene
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1 Mikrochirurgischer Gewebetransfer

Im klinischen Alltag der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie hat sich, zur Rekonstruktion von Weichteil- und Knochendefekten im Kopf- und Halsbereich bei Patienten mit Tumorerkrankungen sowie bei traumatischen und anlagebedingten Fehlbildungen, der mikrochirurgische Gewebetransfer als Mittel der Wahl etabliert. Crile et al. forderten 1906 das Prinzip der therapeutisch operativen Radikalität bei Tumoren. Durch die Etablierung des mikrochirurgischen Gewebetransfers konnte eine Erweiterung des Spektrums der als operabel eingestuften Tumore nach Criles Prinzip erfolgen (Crile 1987). In den vergangenen Dekaden ermöglichte der operative und antiseptische Fortschritt sowie die Vertiefung des anatomischen und physiologischen Verständnisses der Gewebepерfusion den Verschluss von ausgedehnten Gewebedefekten in einem einzigen operativen Schritt. Durch eine stetige Verbesserung der Operationsmethoden wird heute die Tumorentfernung möglichst mit einer sofortigen und definitiven rekonstruktiven Maßnahme kombiniert (Reuther 1992). Neben einer suffizienten Defektdeckung und kompletten Einheilung der Transplantate, wird die Erhaltung von Funktion und Ästhetik, oft subsummiert als postoperative Lebensqualität, als wichtiges Ziel einer rekonstruktiven Maßnahme angestrebt (Ehrenfeld and Mast 2000, Mücke et al. 2011b). Der freie mikrochirurgische Gewebetransfer wird daher schon seit über 30 Jahren als unverzichtbarer Bestandteil der operativen Tumorthapie angesehen (Ehrenfeld and Riediger 1990, Schmelzeisen et al. 1991). Für die Wiederherstellung, beispielsweise nach ablativer Tumorchirurgie mit mikrovaskulären anastomosierten Transplantaten, werden Erfolgsquoten, das heißt Transplantate mit erfolgreicher Einheilung auch nach Revision oder Komplikationen, zwischen 74-85 % angegeben (Germain et al. 2004, Wolff et al. 2008).

Eine mikrochirurgische Anastomosierung der Transplantate ist nur dann möglich, wenn für die Anastomose in der Defektregion geeignete Anschlussgefäße zur Verfügung stehen. Die Durchblutung der Anschlussgefäße kann durch unterschiedliche Voraussetzungen des Patienten deutlich erschwert sein. So

profitieren Patienten zwar von einer Rekonstruktion bei stattgehabter Tumorresektion (Mücke et al. 2010b), das Auftreten eines Rezidives, Bestrahlung, bedingt durch Tumortherapie, ausgedehnte Voroperationen am Hals, Infektionen, ein allgemein schlechter Gefäßstatus, eine erfolgte Strahlentherapie oder fehlgeschlagene Versuche von erfolgten Rekonstruktionen können jedoch ein Limitationsfaktor für diese rekonstruktive Option sein (Martin et al. 2005, Shaari et al. 1998, Mücke et al. 2012a). Da die Anschlussgefäße im Halsbereich durch Arteriosklerose oder Bestrahlung nicht mehr für eine Anastomose zu verwenden sind oder aufgrund von Voroperationen komplett entfernt wurden, können die Defekte am sogenannten „vessel depleted neck“ oft nicht versorgt werden. Sofern diese Operationen durchgeführt werden, müssen am „vessel depleted neck“ besondere Operationsverfahren zur Anwendung kommen, die grundsätzlich mit einem höheren Operationsrisiko behaftet sind. Beispiele hierfür sind das Einbringen von Interponaten oder Loops, die Verwendung des thoracoacromialen, des intrathorakalen Gefäßsystems, der V. cephalica als Drainagegefäß oder die Nutzung der „carrier-Technik“ (Wolff, Holzle and Eufinger 2003, Frick, Baumeister and Furst 2002, Mehrara et al. 2003, Brenman et al. 1990, Wolff et al. 2009). So ist eine weitere Möglichkeit die Anwendung des „wrist carrier flap“, bei dem die Rekonstruktion unabhängig vom Gefäßstatus am Hals erfolgen kann (Wolff et al. 2003). Bei diesem Transplantat kann z.B. ein fasziokutanes Radialistransplantat am Unterarm gestielt bleiben, während weitere Transplantate in Serie anastomosiert werden. Die Rekonstruktion im Kopf-Hals Bereich kann so ohne mikrochirurgische Anastomose erfolgen. Durch ischämische Konditionierung kommt es zur Autonomisierung des Transplantates bevor der Lappenstiel durchtrennt werden kann (Wolff et al. 2009). Die Rekonstruktion mit dieser Art von Transplantat setzt aber sowohl eine hohe operative Belastbarkeit sowie Compliance als auch ein hohes Maß an operativer Erfahrung voraus, so dass ein Großteil der Patienten, die eine Rekonstruktion in dieser Form benötigen, unversorgt bleibt. Folglich ist ein wesentliches Hindernis für die Planung für diese Art von Transplantat oder weiterer Rekonstruktionen die bis dato bestehende Annahme einer langfristigen Abhängigkeit des Transplantates von der Integrität seines Gefäßstiels. Ein wichtiger Aspekt für die Planung des Zeitpunkts der Stielunterbindung ist also die Frage des Zeitpunkts der Autonomisierung des Transplantates. Weiterhin besteht auch bei notwendigen Zweit- oder Dritteingriffen aufgrund der Entstehung eines Rezidives oder bei funktionellen und ästhetischen Einschränkungen der Patienten das

Risiko der Verletzung des Gefäßstiels des bereits erfolgreich eingebrachten Transplantates (Wise et al. 2010). Eine Abhängigkeit des mikrochirurgischen Transplantates vom Gefäßstiel ist trotz erfolgreicher Einheilung in den Gewebedefekt möglich (Machens et al. 1998). Die Zeitdauer der Abhängigkeit des Gewebetransplantates vom Gefäßstiel bis zur Autonomisierung wird in der Literatur zwischen 18 Tagen (Wolff et al. 2009) und zehn Jahren angegeben (Machens et al. 1998, Chubb, Rozen and Ashton 2010).

1.2. Gewebetransplantate

1.2.1 Mikrovaskuläre Transplantate

Je nach geweblicher Zusammensetzung des Transplantates unterscheidet man zwischen dem faszikulären Transplantat, als Beispiel hierfür ist der "radial forearm flap" oder Radialislappen anzuführen, gestielt durch die A. Radialis. Ein in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie häufig verwendetes Transplantat zur Versorgung eher oberflächlicher Defekte (Soutar et al. 1983). Myokutane Transplantate, wie zum Beispiel der M. latissimus dorsi-Lappen, M. rectus abdominis-Lappen oder M. vastus lateralis-Lappen sind zur Deckung von tieferen Defekten geeignet (Hausamen et al. 2012). Osseoseptokutane Transplantate wie das Skapulatransplantat (Silverberg, Banis and Acland 1985), Beckenkamm- (Taylor and Watson 1978) oder Fibulatransplantat (Chen and Yan 1983) dienen der Versorgung von Knochendefekten. Eine ausführliche Beschreibung weiterer mikrovaskulärer Transplantate haben Wolff und Hölzle (Wolff and Hölzle 2011) beschrieben.

1.2.2 Perforatortransplantate

Seit der Einführung der Perforatorlappen (Koshima and Soeda 1989) wurde das Spektrum der freien Lappen nochmals erweitert. Einer Definition nach Wei et al. zufolge basieren Perforatorlappen auf kutanen Gefäßen meist kleinen Durchmessers, die von einem Hauptast kommend die Faszie oder den Muskel durchqueren, um die Versorgung der Haut zu gewährleisten (Wei et al. 2001). Die Lokalisation des Gefäßes

ist dabei variabel was bei der Präparation des Transplantates beachtet werden sollte (Hausamen et al. 2012). Hallock et al. nahmen eine weitere Einteilung vor und unterteilten indirekte von direkten Perforatorgefäßen. Entsprechend dem anatomischen Verlauf nehmen direkte Perforatorgefäße ihren Ursprung von den Hauptarterien, folgen den intermuskulären Septen und Muskeln ohne Durchquerung, um direkt zur Haut zu verlaufen. Indirekte Perforatorgefäße sind nur durch intramuskuläre Präparation verfolgbar, da sie die Muskulatur durchqueren (Hallock 2003a).

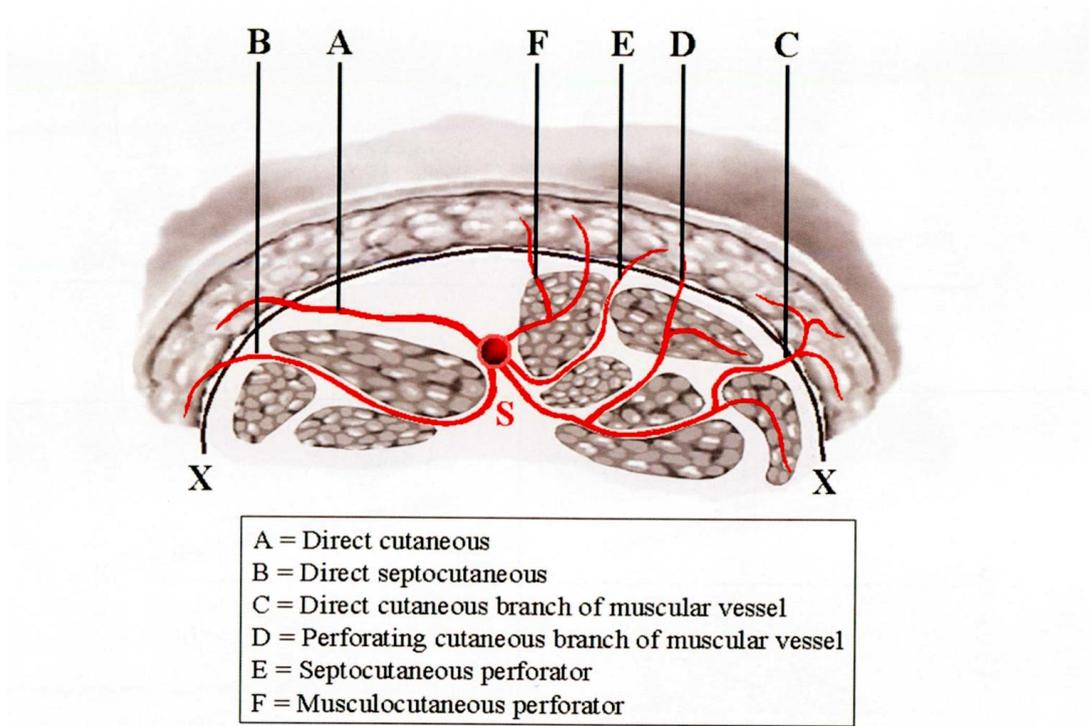


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Perforatortypen (Hallock 2003a).

Perforatorlappen erfreuen sich in der rekonstruktiven Chirurgie immer häufigerer Beliebtheit, was v.a. in ihrer Vielseitigkeit und geringer donor-site Morbidität begründet liegt. Die Größe des Perforatorlappens ist abhängig von der Größe und Anzahl der Perforatoren, dem Volumen des Gewebes und der Verzweigung der Gefäße innerhalb des Transplantates. Ein Nachteil ist die Unbeständigkeit der Lokalisation der Perforatoren und die Gefahr der Entwicklung eines Vasospasmus der Perforatorgefäße, mit der daraus resultierenden Haut oder Fettgewebsnekrose. Wird

die Durchblutung des Transplantates von mehr als einem Perforator unterstützt, so ergibt sich die Möglichkeit das Design des Transplantates flexibler zu gestalten und das Risiko eine totale Lappennekrose zu entwickeln ist geringer (Hölzle 2006). Bisherige Studien befassen sich v.a. mit theoretischen Modellen über den Einfluss der Anzahl der Perforatoren auf die Vitalität der Transplantate (Patel and Keller 2008, Rubino et al. 2006). Die klinisch operative Vorgehensweise, die Planung der Transplantatgröße sowie der Anzahl zu präparierenden Perforatoren, beruhte bisher hauptsächlich auf der klinischen Erfahrung des Operateurs.

1.2.3 Lokale Hautlappenplastiken

Eine weitere Möglichkeit des Wundverschlusses sind lokale Hautlappenplastiken. Diese können nach der Blutversorgung oder der Verlagerung des Transplantats eingeteilt werden. Die Verlagerung kann z.B. durch Rotation (Rotationslappenplastik), Vorschub (Advancement-Flap) oder Transposition (Transpositions-lappenplastik) erfolgen. Hinsichtlich ihrer Blutversorgung unterscheidet man Hautlappen vom axial pattern Typ und vom random pattern Typ (Song et al. 2007).

1.2.3.1 Das Modell des axial pattern flap

Der axial pattern flap wird von einem anatomisch genau definierten Gefäßbaum versorgt, dieser mündet basal in das Transplantat ein. Beispiele hierfür sind die laterale Stirnlappenplastik, welche durch die A. temporalis superficialis versorgt wird. Oder die hypogastrische Hautlappenplastik, welche durch die A. circumflexa ilium superficialis versorgt wird sowie die hypogastrische Hautlappenplastik, deren zuführendes Gefäß die A. epigastrica superficialis ist (Blondeel et al. 1997, Song et al. 2007, Hayden and Nagel 2013).

1.2.3.2 Das Modell des random pattern flap

Bei der Lappenplastik des random pattern Typs liegt kein definiertes, basal gestieltes Gefäß vor. Der desmosubdermale Plexus wird von muskulokutan und fasziokutan perforierenden Gefäßen gespeist. So sind diese Art von Lappenplastiken theoretisch an der gesamten Körperoberfläche verfügbar. Limitierend ist jedoch die Breite der verbleibenden Gewebsbrücke, durch die ausschließlich die Blutversorgung der Lappenplastik erfolgt. So sollte bei der Präparation ein Längen-Breiten-Verhältnis von 2:1, im gut durchbluteten Gesichtsbereich von 3:1 nicht überschritten werden, um eine ausreichende Blutversorgung des random pattern flaps zu gewährleisten (Milton 1970, Song et al. 2007). Beispiele hierfür sind Z-Plastiken, VY-Plastiken und U-Lappen (Hausamen et al. 2012).

1.3 Transplantatmonitoring

Eine ungestörte Perfusion mit suffizienter Gewebeoxygenierung ist Voraussetzung für die postoperative Vitalität mikrochirurgischer Transplantate (Kamolz et al. 2002). Die kritische Ischämiezeit entspricht der Dauer eines ischämischen Zustandes, vom Absetzen bis zum mikrochirurgischen Anschluss und Perfusion des Transplantats, die vom Gewebe toleriert wird, ohne dass irreversible Gewebeschäden resultieren. Sie ist temperaturabhängig und variiert in Abhängigkeit von der Gewebezusammensetzung zwischen zwei und acht Stunden (Eckert and Schnackerz 1991, Picard-Ami, Thomson and Kerrigan 1990). Kommt es zu einer rechtzeitigen Revision bei Thrombosierung der mikrochirurgischen Anastomose, so können Erfolgsraten von über 70 % erzielt werden (Hirigoyen, Urken and Weinberg 1995, Heller, Levin and Klitzman 2001). Limitierend für das Zeitintervall einer erfolgreichen Revision ist das now-reflow Phänomen (May et al. 1978). Dieses enge Zeitintervall sowie die hohen Erfolgsraten bei rechtzeitig durchgeführter Revision verdeutlichen die Notwendigkeit einer optimalen postoperativen Überwachung der Lappenvitalität (Hölzle 2006). Ziel des Transplantatmonitorings ist es, möglichst frühzeitig und zuverlässig eine Veränderung der Perfusionssituation im Transplantat zu detektieren. Laut Hirigoyen et al. bildet die Basis der postoperativen Lappenüberwachung die klinische Einschätzung (Hirigoyen et al. 1995), mit Beobachtung der Rekapillarierungszeit, der Lappenfarbe und die

Prüfung einer Blutung nach Punktion/Inzision (Chao et al. 2013). Nachteil dieser sehr subjektiven Überwachungsmethode ist, dass die Veränderungen im Gewebe erst dann zu erkennen ist, wenn der Ischämiezustand schon einige Stunden zuvor eingetreten ist (Hölzle 2006).

Daher wurde seit Beginn des mikrochirurgischen Lappentransfers nach suffizienten Transplantatmonitoringmethoden gesucht, mit deren Hilfe ein solches Überwachen objektiv und frühzeitig erzielt werden kann. Etabliert hat sich dabei die Anwendung der Laser Doppler-Flowmetrie (Yuen and Feng 2000, Mücke et al. 2014) sowie der Einsatz von Doppler-Sonographie (Solomon, Yaremchuk and Manson 1986, Lohman et al. 2013). Diese Methoden gelten als einfach und zuverlässig durchführbar und werden im Bereich der Gefäßchirurgie als Standardmethode angewandt (Mücke et al. 2010a). Auch farbkodierte Duplexsonographie (Schon et al. 2002), ICG- Angiografie (Mücke et al. 2020, Mücke et al. 2013), elektromagnetische Flowmetrie (Eriksson and Heden 1988), 3-D-Ultraschall (Langer et al. 2001), Sauerstoffpartialdruckmessung (Kamolz et al. 2002), Phosphoreszenz- und Lumineszenztechniken (Lubbers, Koster and Holst 1996), Photoplethysmografie (Futran et al. 2000), Pulsoxymetrie (Strauss et al. 1994), Gewebespektrometrie (Schultze-Mosgau et al. 2003), Temperaturmessungen (Kaufman et al. 1987), pH-Messungen (Warner et al. 1989) und Hämatokritkontrollen (Kerrigan and Daniel 1983) sind angewandte Monitoringverfahren, von denen sich jedoch keine Methode als Standard zur kontinuierlichen Gewebetransplantatüberwachung durchsetzen konnte. Eine Kombination aus Doppler-Flowmetrie und Gewebespektrometrie, die in sogenannten O2C-Geräten (Oxygen to see) zum Einsatz kommen, hat sich im Bereich des Lappenmonitorings etabliert. Durch diese objektive und non-invasive Methode ist eine Differenzierung zwischen arterieller und venöser Perfusionsstörung möglich. Diese Methode trägt dazu bei, vaskuläre Beeinträchtigungen im Rahmen des Transplantatmonitorings in einem frühen Stadium nachzuweisen, um rechtzeitig vaskuläre Komplikationen zu beheben, um die Vitalität der Transplantate zu gewährleisten (Hölzle et al. 2012).

1.4 VEGF und Angiogenese

VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein homodimeres Glykoprotein und gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Es spielt eine zentrale Rolle in der embryonalen und adulten Vaskulogenese, Angiogenese, Lymphangiogenese sowie Arteriogenese. Weiterhin wird die Permeabilität von Gefäßen durch VEGF reguliert (Uccelli et al. 2019). Es sind verschiedene Isoformen bekannt, die als VEGF-A bis -F sowie der Plazenta-Wachstumsfaktor (placental growth factor, PlGF) bezeichnet werden. Das menschliche Gen für VEGF befindet sich auf Chromosom 6p21.3, bestehend aus acht Exons, getrennt durch sieben Introns. Vom VEGF-A können durch alternatives Splicen mehrere Isoformen unterschieden werden (VEGF-A₁₂₁, ₁₄₅, ₁₄₈, ₁₆₂, _{165a}, _{165b}, ₁₈₃, ₁₈₉, ₂₀₆). Diese unterscheiden sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenz, in ihren biologischen Eigenschaften und in der Fähigkeit an Zelloberflächen zu binden (Robinson and Stringer 2001, Takahashi and Shibuya 2005, Houck et al. 1991).

VEGF-A ist ein wichtiges Protein im Angiogeneseprozess und besitzt wichtige angiogenetische, mitogene, permeabilitätsteigernde und vasodilatative Eigenschaften (Senger et al. 1993, Dvorak et al. 1995, Ferrara, Gerber and LeCouter 2003, Isner and Takayuki 1998). Da nur VEGF-A an die beiden Rezeptoren bindet, die für die Angiogenese verantwortlich sind (Beazley-Long et al. 2013), liegt der Fokus in einer Isoform dieses Polypeptids und wird im Folgenden als VEGF bezeichnet. Die Expression von VEGF kann durch Hypoxie, Hypoglykämie, aktivierte Onkogene und verschiedene Zytokine induziert werden (Neufeld et al. 1999). So werden beispielsweise durch einen Mangel an Sauerstoff im Gewebe, über die Aktivierung von Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) proangiogenetische Expressionsmuster induziert (Dor, Porat and Keshet 2001). Dieser induziert eine vermehrte Expression vom zentralen Signalmolekül VEGF in die Zellen. VEGF wird in Nähe des Wirkungsortes exprimiert und wirkt dort vor allem parakrin auf die Endothelzellen (Löffler 2008). Auch mehrere andere Wachstumsfaktoren können die Expression von VEGF hochregulieren. So wird ebenfalls bei lokaler Hypoxie die VEGF Sekretion durch parakrine und autokrine Sekretion von Faktoren wie dem epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF- α und TGF- β), keratinocyte growth factor (KGF), fibroblast growth factor (FGF) und platelet-derived growth factor (PDGF) reguliert (Ferrara and Davis-Smyth 1997, Neufeld et al. 1999). Weiterhin induzieren auch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 α und Interleukin-6 die

VEGF Expression (Ferrara et al. 2003). VEGF induziert eine Änderung der Morphologie in einigen Endothelzellen. In der Frühphase der Angiogenese erhöht VEGF die Permeabilität des Endothelverbandes und ermöglicht die Extravasation von Plasmaproteinen (Carmeliet 2000). Manche Endothelzellen (Tip-Zelle in Abb.2) entwickeln kleine Filopodien, diese bilden die Spitze eines neuen Sprosses, indem sie sich zur Quelle des VEGFs hin orientieren. Die Endothelzellen vermehren sich und formen eine neue Zellmasse. Andere Endothelzelle bilden die Sprossbasis (Stalk in Abb.2). Durch den Kontakt von Tip-Zellen wachsen neue Brückenzellen (orange in Abb.2) und diese formen neue röhrenförmige Blutgefäßsprosse (Adams and Alitalo 2007). Angiogenese ist als Summe dieser Prozesse definiert: die Sprossung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Carmeliet 2000).

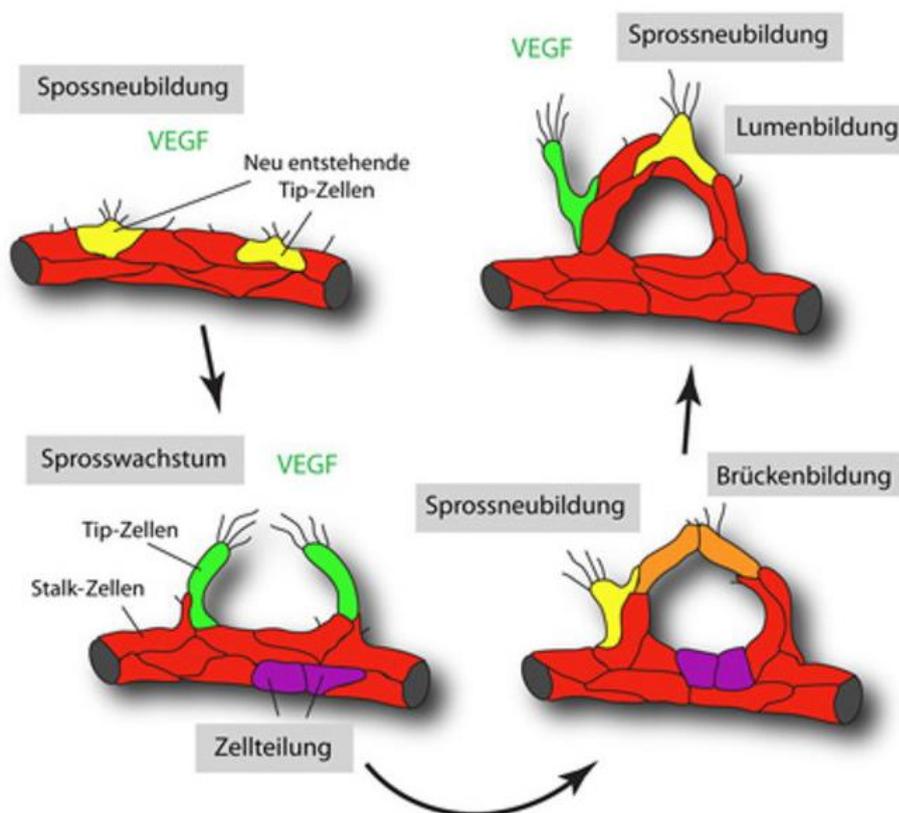


Abbildung 2: Schematisch dargestellter Ablauf der Bildung eines neuen Blutgefäßes. Abbildung aus (Benedito 2010).

Da die definitive Autonomisierung eines primär nicht vaskularisierten Transplantates von der Angiogenese und sicheren Blutversorgung aus dem Transplantatlager abhängig ist, stellen Maßnahmen zur Beschleunigung der Angiogenese durch die Anwendung von VEGF einen vielversprechenden Ansatz dar. Experimentelle Studien zeigen einen positiven Effekt von VEGF im Wundbett bei ischämischen Defekten und eine schnellere Heilung bei Injektion oder Applikation von VEGF (Frangoulis et al. 2007, Michlits et al. 2007).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel in der Versuchsgruppe I der vorliegenden Arbeit war es, die Autonomisierung von mikrochirurgischen epigastrischen Transplantaten an der Ratte systematisch zu untersuchen, um herauszufinden wie viel Einheilungszeit ein durch die A. und V. femoralis gestieltes, epigastrisches Lappentransplantat benötigt, um unabhängig von der Gefäßversorgung dieses Hauptgefäßes vital zu bleiben. Weiterhin galt es, den Zeitraum der Einheilung zu definieren und herauszufinden, wie frühzeitig die Blutversorgung des Transplantates reduziert werden kann, um eine möglichst schnelle Gefäßsprossung zu erreichen. Um diesen Zeitpunkt zu ermitteln, wurden unterschiedliche Zeitpunkte gewählt, an denen der Lappenstiel unterbunden wurde. Zusätzlich sollten durch kontinuierliches Monitoren die Transplantateinheilung und die Vorhersage einer Nekroseentwicklung durch objektive, non-invasive Messung untersucht werden.

Die Perforatorlappen werden in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie erfolgreich verwendet jedoch war bisher nicht geklärt, wie viele dieser Perforatoren notwendig sind, um die Vitalität eines Transplantates zu gewährleisten. So sollte in Gruppe II dieser Arbeit geprüft werden, ob bei kontinuierlicher Durchblutung eine Reduktion des Nähr- und Sauerstoffangebots eines Hautlappentransplantats toleriert wird, um vital zu

bleiben und den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Perforatoren und der versorgenden Transplantatfläche zu finden.

Ein viel versprechender Ansatz, die Autonomisierung von Hautlappen effektiv und quasi non-invasiv zu beschleunigen, ist mit der Anwendung von VEGF verbunden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Einheilung der Lappentransplantate unter dem Einfluss von VEGF zu untersuchen, um die Einheilungszeit zu verkürzen und herauszufinden, welchen Effekt die Applikation sowie der Applikationszeitpunkt von VEGF auf die Angiogenese und die Autonomisation von epigastrischen Transplantaten und Perforatortransplantaten hat.

Daraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

1. Wie lange benötigen dünne autologe Hauttransplantate, um vom Gefäßstiel unabhängig zu sein?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Perforatoren und der versorgenden Transplantatfläche?
3. Werden durch Injektion von Wachstumsfaktoren wie VEGF in das Transplantatlager dünne Hauttransplantate schneller einheilen?
4. Wie relevant ist der Zeitpunkt der VEGF Applikation für eine Verbesserung der Einheilungsgeschwindigkeit und des vitalen Gewebeanteils?
5. Kann durch die Laser-Spektroskopie (O2C) eine Vorhersage von Nekroseentwicklungen der verschiedenen Gewebetransplantate getroffen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsmodelle

2.1.1 Epigastrisches Transplantat

In der vorliegenden Studie wird das Lappenmodell nach Strauch und Murray (1967) verwendet. Hierbei wird das mikrovaskuläre Transplantat auf Basis der superfiziellen epigastrischen Gefäße gehoben. Die epigastrischen Gefäße, bestehend aus Arterie und Vene versorgen die Haut mit dem subkutanen Fettgewebe der Leistengegend und die unteren Zweidrittel des Abdomens (Oesterwitz, Ghods and Geomelas 2014). Bei dem Lappenmodell von Murray und Strauch sollte ein Längen-zu-Breiten-Verhältnis von 2:1 nicht überschritten werden, da sonst eine suffiziente Durchblutung des distalen Teils des Lappens nicht gewährleistet werden kann. Durch eine Überdimensionierung des Längen-Breiten-Verhältnisses ist eine Nekrosebildung im distalen Teil des Transplantates zu erwarten. Dieses Modell wurde gewählt, um eine Vergrößerung der vitalen Transplantatfläche und damit eine Reduktion des Nekrosegebietes darstellen zu können. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in Kapitel 2.2.4 Operationen.

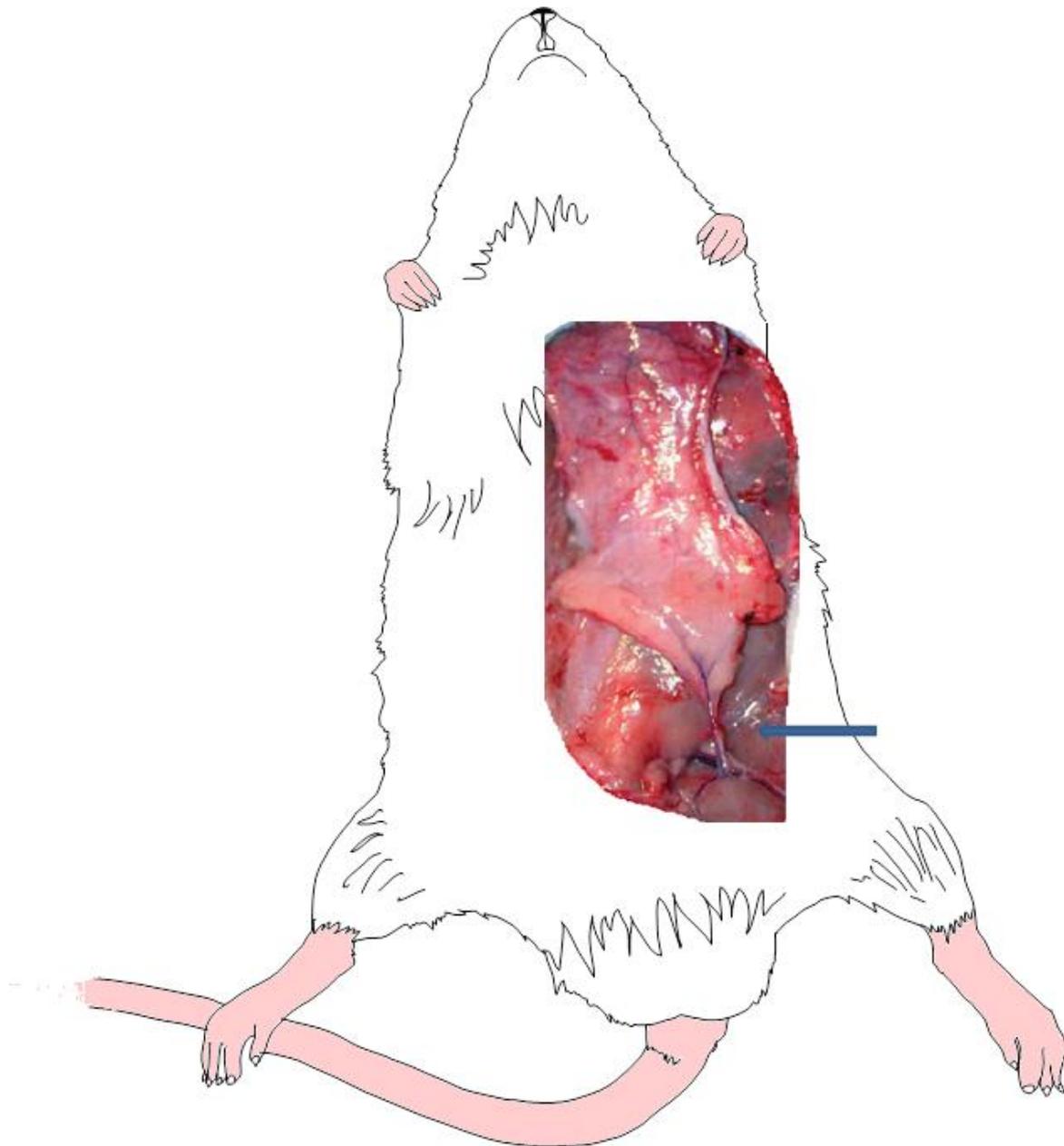


Abbildung 3: Gehobenes epigastrisches Lappentransplantat. Blauer Pfeil weist auf den Gefäßstiel mit A. und V. epigastrica, Abgänge aus A. und V. femoralis, modifiziert nach Mücke und Fichter.

2.1.2 Perforatortransplantat

Alternativ zum epigastrischen Transplantat werden die kleinen Perforatorgefäße, die durch die Muskelfaszie hindurch treten und die Haut inserieren (Wolff et al. 2007), zur Durchblutung des Perforatortransplantates belassen. Der epigastrische Lappenstiel wird ebenfalls präpariert, jedoch nach Darstellung der Perforatoren unterbunden.

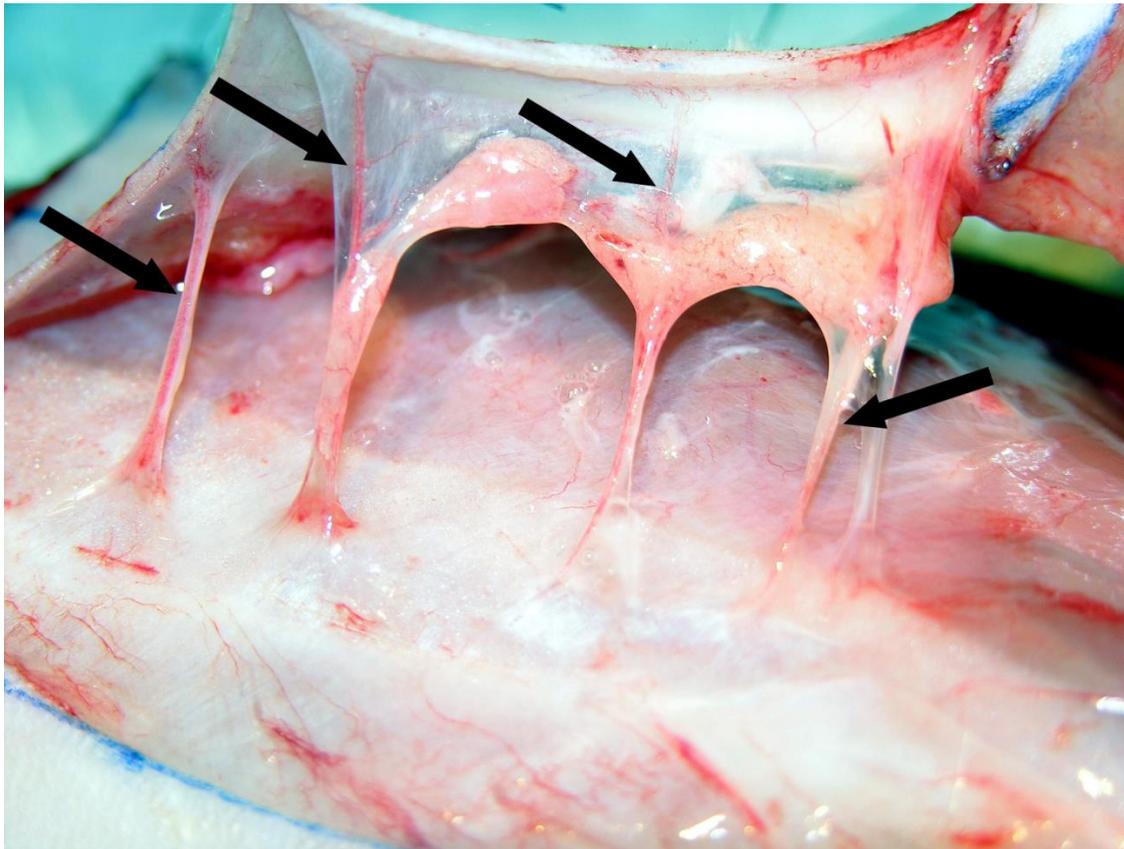


Abbildung 4: Perforatortransplantat einer Ratte, schwarze Pfeile markieren die Perforatoren.

2.2 Studienaufbau

2.2.1 Versuchstiere und Haltung

Die Untersuchungen wurden an männlichen Wistar-Ratten der Firma Charles-River mit einem durchschnittlichen Gewicht von 350g durchgeführt. Alle Tiere wurden gemäß den EU-Richtlinien 86/609 festgelegten Bedingungen behandelt und gehalten. Das Tierschutzvorhaben ist gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden (Aktenzeichen 55.2-1-54-253-86-08). Nach Lieferung durch „Charles River Laboratories International, Inc.“ wurden die Tiere gewogen und eine tierärztliche allgemeine Untersuchung durchgeführt. Danach erfolgte für die Tiere eine Eingewöhnungszeit von mindestens 14 Tagen. Die Ratten wurden in Gruppen von 2-3 Tieren in Makrolon®-Standardkäfigen Typ IV gehalten. Ein

künstlicher 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatische Beleuchtungssteuerung simuliert. Futter (Rattenpellets 1320, Altromin GmbH, Laage) und Wasser (Trinkwasser aus Trinkflaschen bei täglichem Wechsel) erhielten die Tiere ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 20-25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55-65%. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und täglich visitiert, um Putzverhalten, Aktivität, Automutilationszeichen und Zeichen für Infektionen zu beurteilen. Die Reinigung der Käfige erfolgte wöchentlich.

2.2.3 Narkose

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte durch Isofluran-Kurznaarkose 2-3 % (Baxter International inc., Deerfield, IL) in einer Ganzkörperkammer. Anschließend erhielten die Tiere eine intraperitoneale Kombinationsanästhesie aus Ketamin 100mg/kg KGW (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazin 5mg/kg KGW (Rompun®, Bayer vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) als Gemisch intraperitoneal. Das intraoperative Monitoring erfolgte durch Kontrolle der Vitalparameter. Während der Narkose wurden Atmung und Puls durch ein Pulsoxymeter (mediquip Medizintechnik, Kirchzarten) sowie die Körpertemperatur mittels rektaler Temperatursonde überwacht. Die Positionierung der Tiere erfolgte auf einem Korkbrett mit einem automatisch, über die Rektalsonde regulierbarem Wärmekissen (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC, Canada). Die Narkosetiefe wurde regelmäßig, unter Beobachtung der Vitalparameter kontrolliert und die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels Ketamin 33mg/kg KGW und Xylazin 1,6 mg/kg KGW alle 30 Minuten. Die Desinfektion des Operationsbereiches erfolgte mit Cutasept®-Lösung.

2.2.4 Operationen

2.2.4.1 Lappenbildung epigastrisches Hauttransplantat

Die Lappenhebung erfolgte nach der Methode von Strauch und Murray (Strauch and Murray 1967). Nach Einleiten der Narkose und Erreichen der chirurgischen Toleranz (III²) wurde der Abdomenbereich rasiert sowie desinfiziert. Dann wurde ein Hautareal von 4x7 cm unter Zuhilfenahme einer Schablone eingezeichnet. Die Schablone wurde dabei leicht mittellinienüberschreitend sowie unterhalb des angenommenen Verlaufes des Leistenbands zum Einschluss des Gefäßstiels ausgerichtet (Abbildung 5).

Die Schnittführung für die Lappenhebung erfolgte entlang der eingezeichneten Begrenzung. Nach Umschneidung mit dem Skalpell wurde der Hautlappen vorsichtig präpariert. Dabei wurden Kutis und Subkutis gemeinsam von der vorderen Rektusscheide abgelöst und alle versorgenden Perforatorgefäße durchtrennt und koaguliert (Erbotom Modell ICC 350 von Erbe (Tübingen, Deutschland)).

Unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops (Zeiss OPMI, Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen) sowie von Mikroinstrumenten (Spingler&Tritt, Neuhausen Schweiz) wurden die A. und V. femoralis durch sorgfältiges Präparieren über eine Länge von ca. 2cm freigelegt, bis der Abgang der superfiziellen epigastrischen Arterie und Vene sichtbar wurde. Diese verlaufen im inguinalen Fettgewebe nach kranial und versorgen die Haut sowie das subkutane Gewebe der Leistenbeuge und die unteren Zweidrittel des Abdomens. Diese Gefäße, im Folgenden als Gefäßstiel bezeichnet, wurden über eine Länge von ca. 1cm schonend präpariert (Abbildung 6). Die erhaltene Durchblutung des Lappentransplantates durch den Gefäßstiel wurde durch das O2C Gerät (Messung der lokalen Durchblutung, Sauerstoffkonzentration, Hämoglobinspiegel, sowie Flussrate des Blutes) kontrolliert und dokumentiert.

Nach Lappenhebung und Blutstillung wurde der Lappen in seinen ursprünglichen Bereich zurückverlagert und ein kompletter Wundverschluss mittels Einzelknopfnähten erreicht (5-0 Ethilon, Ethicon, Norderstedt Germany).

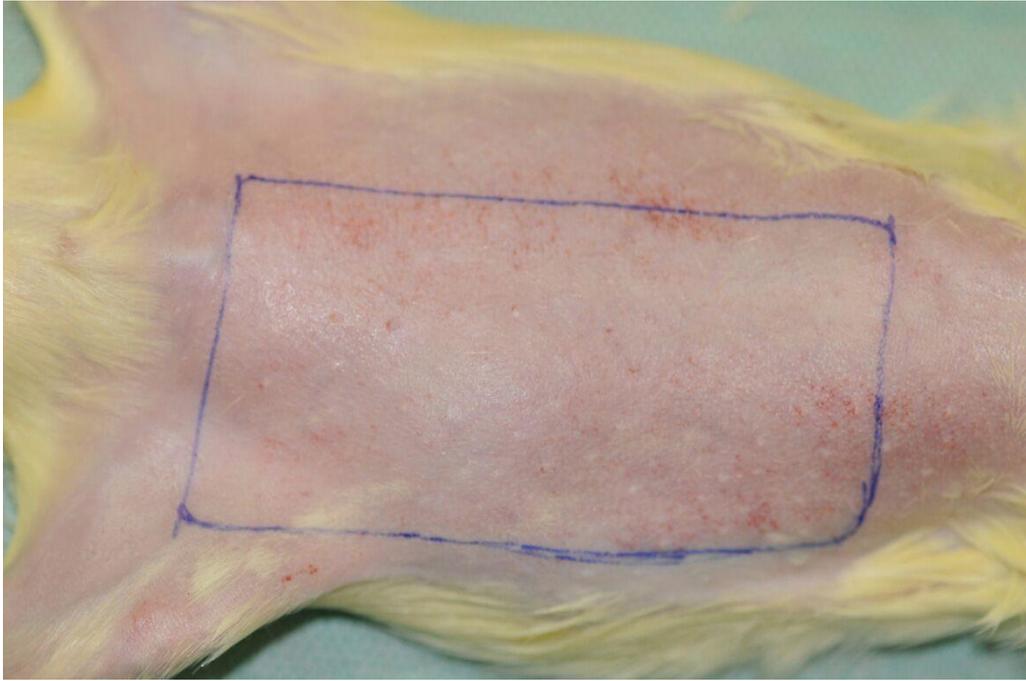


Abbildung 5: Ingezeichnetes epigastrisches Transplantat vor Hebung

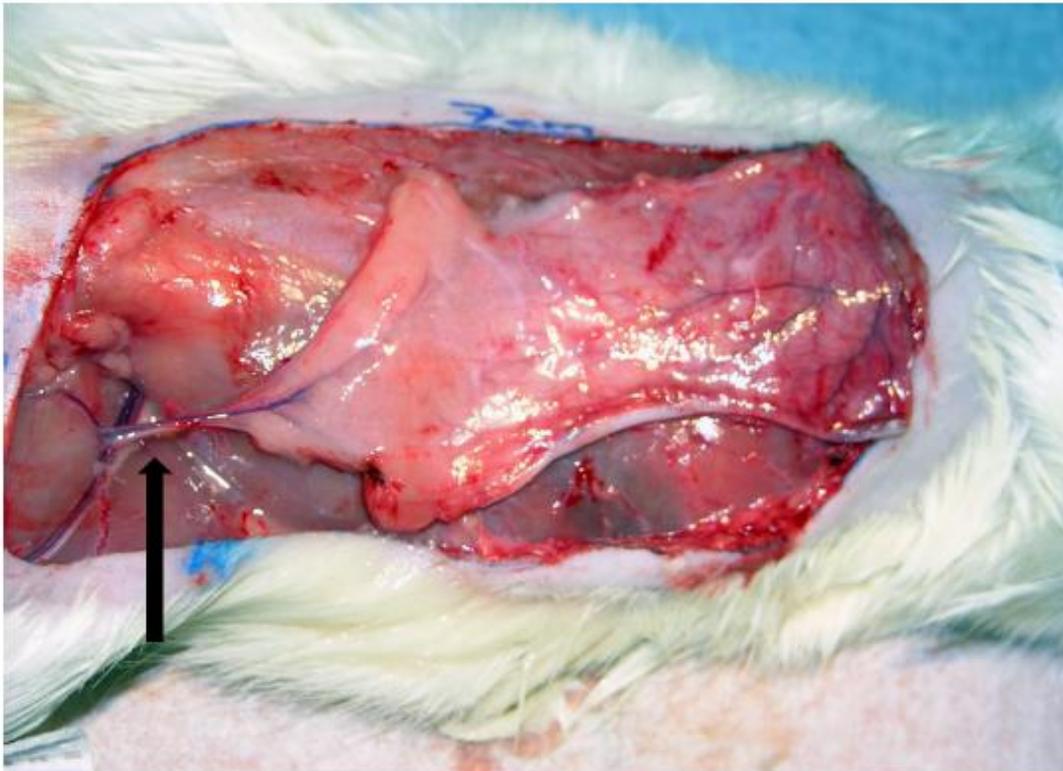


Abbildung 6: Darstellung des gehobenen epigastrischen Gewebetransplantates. Der schwarze Pfeil weist auf den perfundierenden Gefäßstiel.

An jeweils sechs Tieren erfolgte nach drei, fünf, sieben oder zehn Tagen eine Legierung und Durchtrennung des Gefäßstiels. Dafür wurde in kurzer Isoflurannarkose (Einleitung in der Ganzkörperkammer 2-3% und Fortführung der Anästhesie in der Kopfkammer 1,5-2%) gearbeitet. Dann erfolgte am caudalen Lappenrand ein 1 cm langer Zugang durch Inzision mit dem Skalpell und Aufsuchen des Femoraldreiecks. Unter mikroskopischer Sicht wurden die A. und V. epigastrica superficialis dargestellt. Es erfolgte die Legierung des Gefäßstiels mit einem Ethilon 9-0 Faden (Ethicon, Norderstedt/Deutschland) und die Durchtrennung des Stiels. Danach erfolgte die Messung der lokalen Durchblutung mit dem O2C-Gerät, anschließend der Verschluss der Hautinzision mittels Einzelknopfnähten (5-0 Ethilon, Eticon, Norderstedt) und die weitere Beobachtung der Einheilung. Weitere sieben Tage später wurde die Einheilung dokumentiert. Hierfür erfolgten unter erneuter Isoflurannarkose O2C-Messungen sowie die planimetrische Erfassung der Nekrosezonen in mm² durch Fotodokumentation mittels digitaler Spiegelreflexkamera (Typ Nikon D700, Nikon Corp., Chiyoda, Tokio, Japan).

2.2.4.2 Epigastrische Perforatorlappen

Bei der Hebung der Perforatorlappen erfolgte das Vorgehen analog dem der Präparation des epigastrischen Lappentransplantates. Nach Anlegen der Schablone wurde das zu präparierende Hautareal markiert, mit dem Skalpell scharf umschnitten und das Transplantat gehoben. Die Perforatoren wurden dabei lokalisiert und geschont. Das Femoraldreieck wurde aufgesucht und die Femoralgefäße dargestellt. Es folgte die Freilegung der Femoralgefäße bis zur Abzweigung der A. und V. epigastrica superficialis. Es wurde im Unterschied zum epigastrischen Lappentransplantat beim epigastrischen Perforatorlappen die Arteria und Vena epigastrica abgesetzt. Analog dem Vorgehen bei Stielunterbindung. Allein die drei bis vier kleinen Perforatorgefäße, die von der Muskulatur aus die Haut perfundierten, wurden dargestellt und gewährleisteten die Durchblutung des Transplantates (Abbildung 7). Dann erfolgte die Veränderung der Perforatorgefäße chirurgisch: In Gruppe II.1 wurden alle Perforatorgefäße belassen, in Gruppe II.2 wurden die Perforatoren bis auf zwei reduziert. In Gruppe II.3 wurde nur ein Perforator zur Durchblutung des Transplantates belassen. Die suffiziente Transplantatdurchblutung

wurde durch das O2C Gerät vor und nach Lappenhebung kontrolliert und dokumentiert.

Nach sieben Tagen erfolgte in kurzer Isoflurannarkose die Messung der Lappenperfusion durch das O2C-Gerät, durch Fotodokumentation die Evaluierung der Einheilung und Nekrosebildung.

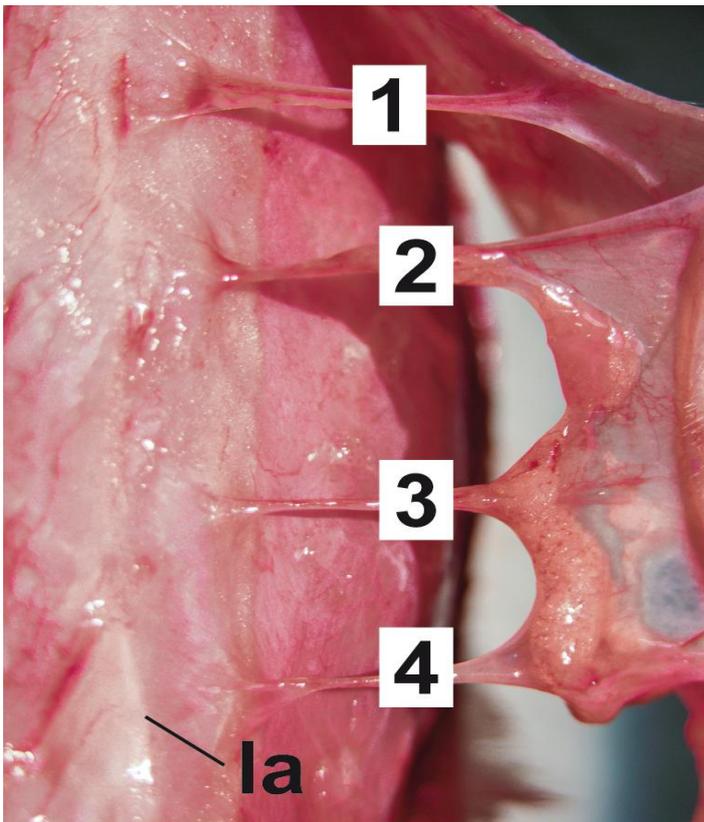


Abbildung 7: Gehobener Perforatorlappen basierend auf vier Perforatoren. la entspricht der Linea alba.

2.3 Bestimmung der Lappen- und Nekrosefläche

Präoperativ, direkt postoperativ und am Versuchsende wurden digitale Fotos von den Tieren und Nekrosezone angefertigt. Die Fotodokumentation erfolgte mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Typ Nikon D700, Nikon Corp., Chiyoda, Tokio, Japan). Diese war an einem Stativ montiert und rechtwinklig zum Transplantat ausgerichtet. In der Ebene des Hauttransplantates wurde ein Größenstandard platziert. Zur Auswertung der Fotos wurde das Programm Image-J v 1.41o (National Institutes of Health, USA) verwendet. Dieses Programm ist ein in Java geschriebenes Bildverarbeitungsprogramm und erfasst die Gesamtzahl der Pixel sowie die Pixelzahl der vom Benutzer ausgewählten Bereiche. Die direkte postoperative Fläche des Transplantates wurde als Anfangswert herangezogen. Das am Versuchsende zur Dokumentation gefertigte Foto wurde ausgewertet und die Größe der vitalen Fläche wurde mit der Nekrosezone verglichen, berechnet und prozentual auf den Anfangswert bezogen. So ergibt sich die Nekroserate aus dem Verhältnis der Pixelzahl des Nekrotischen Bereichs geteilt durch die Pixelzahl des vorher markierten gesamten Lappenriss mal 100 in Prozent.

2.4 Applikation von VEGF

Die Applikation von jeweils 20µl VEGF (hVEGF165, PeproTech, Hamburg, Deutschland) erfolgte abhängig von der Versuchsgruppe entweder prä- oder postoperativ oder zu beiden Zeitpunkten jeweils zirkulär um das Transplantat sowie subdermal im Bereich der Transplantatfläche.

2.5 Technische Apparaturen

2.5.1 O2C

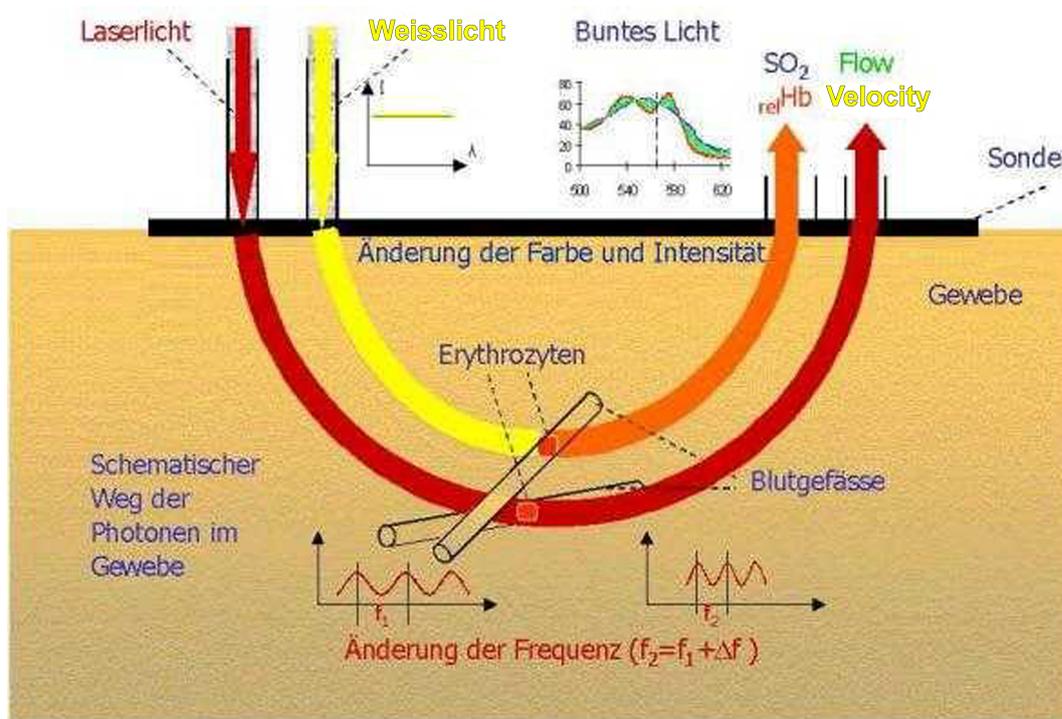


Abbildung 8: Funktionsweise der Gewebe-Photospektrometrie (Krug 2007a).

Die Messungen wurden mit dem optischen Diagnosegerät, dem O2C (Oxygen to see) der Firma LEA Medizintechnik (Gießen) durchgeführt. Bei den O2C-Messungen werden Basisdaten über die individuelle Hämoglobinkonzentration, Hämoglobinoxygenierung des vor allem in den Venolen befindlichen Blutes, Blutfluss und Blutflussgeschwindigkeit gemessen und als Referenzwerte für die Untersuchungen festgelegt. In der vorliegenden Arbeit diente damit das O2C-Gerät der noninvasiven Bestimmung der Parameter SO₂, Hb, Velocity und Flow. Die Angaben der gemessenen Parameter erfolgen dabei in AU („arbitrary units“) für die Parameter Hb, Velocity und Flow sowie in Prozent (%) für die Messung von SO₂.

Die Technologie der transkutanen Erfassung von Durchblutungs- und Sauerstoffparametern beruht auf der Kombination der Laser-Doppler-Spektroskopie und der Gewebespektrometrie (Weißlicht-Spektroskopie). Die Laser-Doppler Spektroskopie dient der Messung von Durchblutungsparametern (Flow und Velocity).

Mittels der Gewebespektrometrie können Hämoglobinoxygenierung und Hämoglobinkonzentration (SO₂ und Hb) ermittelt werden.

2.5.1.1 Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und der relativen Hämoglobinmenge

Bei der Gewebespektrometrie wird mittels einer Glasfasersonde nicht-invasiv, zum einen Weißlicht (Wellenlänge von 500 bis 800nm) und Laserlicht in das Gewebe eingebracht, zum anderen wird das vom Gewebe reflektierte Licht registriert. Das Weißlicht breitet sich nach dem Eindringen diffus im Gewebe aus. Wenn das Weißlicht mit Hämoglobin wechselwirkt, wird ein Teil des Lichtspektrums absorbiert. Dabei ist die Absorptionseigenschaft entscheidend von der Oxygenierung des Hämoglobins abhängig. Der nicht absorbierte Teil des Lichtes nimmt die Farbe des Hämoglobins an. Diese Farbe ist ein Maß für die Sauerstoffsättigung der Erythrozyten. Der auf diese Weise ermittelte Wert gibt die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins in den Kapillaren, Arteriolen und Venolen an. Die relative Hämoglobinkonzentration stellt ein Maß für die Gesamtblutmenge im beleuchteten Gewebevolumen dar. Dieser Parameter errechnet sich aus der Summe der Hämoglobinabsorption aller Wellenlängen und erfasst alle Erythrozyten. Durch Vergrößerung des Abstandes zwischen Illuminations- und Detektionsstelle kann das Licht auch aus größeren Tiefen detektiert werden.

2.5.1.2 Bestimmung des Blutflusses und der Blutflussgeschwindigkeit

Die Laser-Doppler-Spektroskopie beruht auf dem Doppler-Prinzip. Trifft das einfallende Laserlicht auf bewegte Erythrozyten, so wird die Frequenz des Lichtes durch deren Bewegung verschoben (sogenannte Dopplerverschiebung). Die Dopplerverschiebung ist proportional zur Geschwindigkeit der Erythrozyten. Die berechnete Frequenzverschiebung wird vom O2C zum Anzeigeparameter der Blutflussgeschwindigkeit ausgerechnet (Velocity). Das reflektierte Licht ist abhängig von der Bewegung der Erythrozyten sowie deren Anzahl. Je mehr Erythrozyten während der Messung entlang der Sonde fließen, desto stärker wird das detektierte Signal. Die Summe der Erythrozyten und deren Geschwindigkeit sind ein Maß für den Blutfluss (Flow) im komplexen Kapillarnetz (Abbildung 8). Somit entspricht das

Produkt der Geschwindigkeit der Erythrozyten (vi), multipliziert mit der Anzahl der Erythrozyten (Ni), summiert über alle auftretenden Erythrozytengeschwindigkeiten ($\sum i$) dem Blutfluss der Mikrozirkulation

$$\sum i \times vi \times Ni = \text{Blutfluss} \text{ (Krug 2007b).}$$

Im Vergleich zur Ultraschallmessung ist eine genaue Detektion des Gefäßes sowie dessen Querschnittsflächenbestimmung nicht notwendig. Die Parameter geben Aufschluss über die Gewebesituation und erlauben dem Untersucher die Beurteilung der Vitalität des Gewebetransplantates an Hand verschiedener physiologischer Messparameter (Krug 2007a).

2.5.1.3 Ablauf der Messung

Die O2C Messungen wurden zu einem standardisierten Zeitpunkt durchgeführt. Die Messungen erfolgten dabei jeweils präoperativ, nach Stielunterbindung bzw. nach Durchtrennen der Perforatoren und eine Woche nach Stielunterbindung bzw. Durchtrennung der Perforatoren. Die Messung erfolgte jeweils an drei Lokalisationen des Transplantates: Es wurde jeweils im kranialen Drittel, im Zentrum und im kaudalen Drittel unter konstanten Lichtverhältnissen sowie konstantem Druck gemessen (Abbildung 9 und 10).

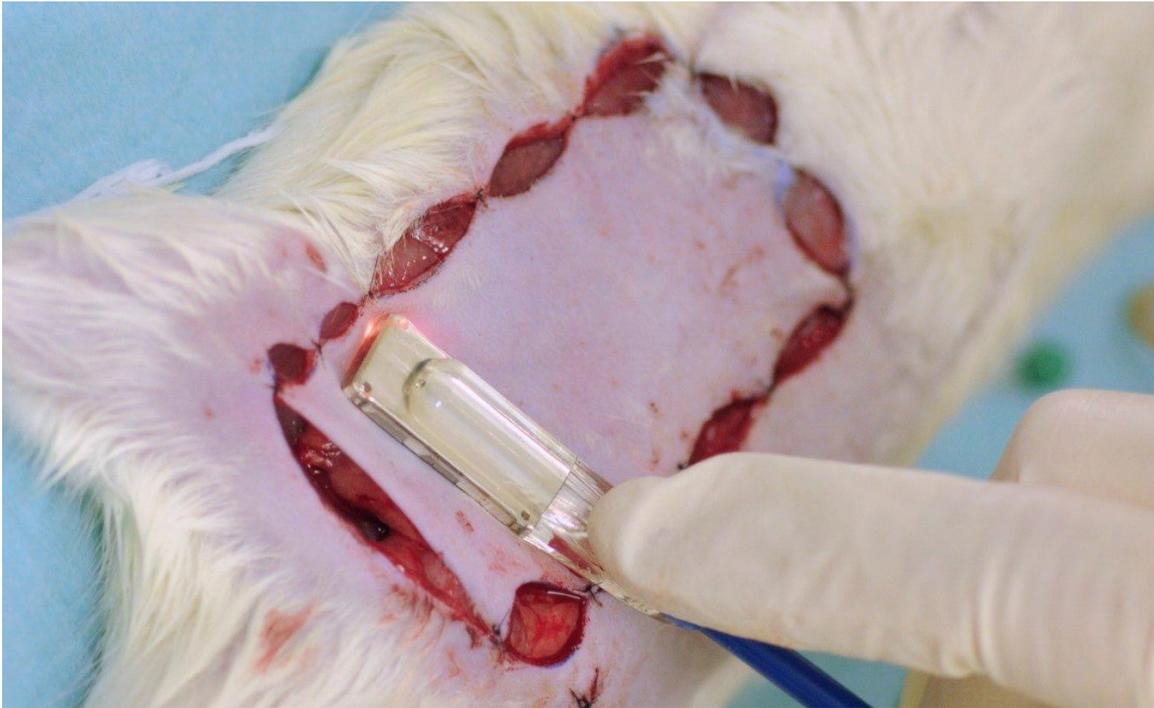


Abbildung 9: Perfusionssmessung mit O2C Sonde.

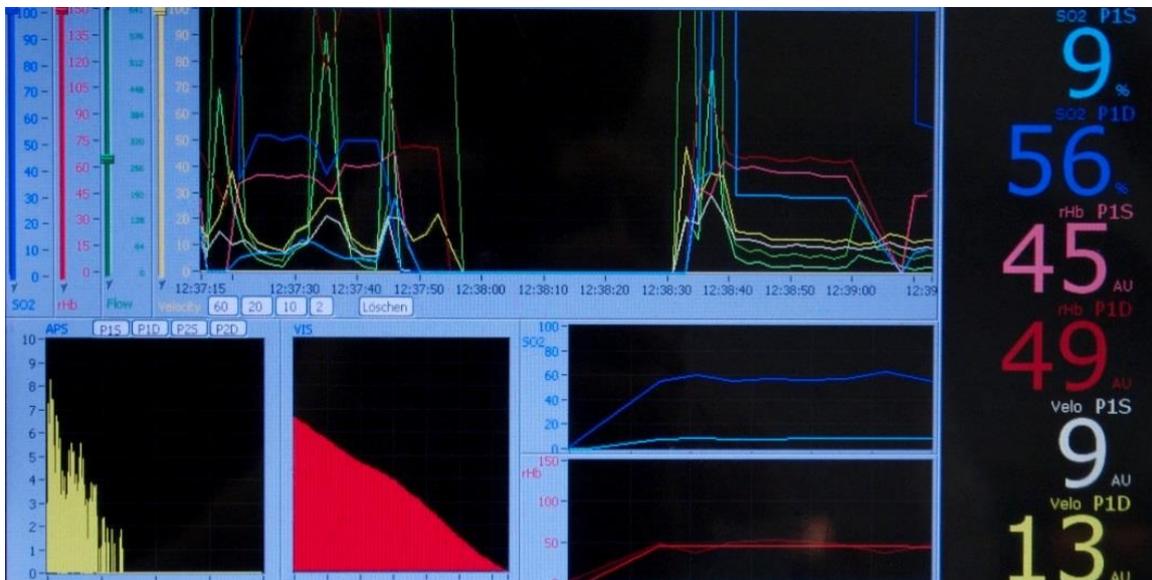


Abbildung 10: Bildschirmansicht im Darstellungsmodus.

2.6 Histologische Untersuchungen

2.6.1 Gewebebegewinnung

Die Gewebeentnahme erfolgte unter o.g. Isofluran Narkose. Nach Rasur und Desinfektion der gesamten Bauchwand wurden die ursprünglichen Markierungen des Transplantates reproduziert, die Kutis vorsichtig abpräpariert und entnommen.

Nach Unterbindung der A. und V. femoralis wurde der Lappen proximal des Abgangs der A. und V. epigastrica inferior unter Mitnahme eines ca. 1cm langen Femoral Gefäß abgesetzt. Es erfolgte die Euthanasie in tiefer Narkose mittels Pentobarbital 60mg/kg KGW (Narcoren® Rhone-Merieux GmbH, Laupheim). Die Transplantate wurden anschließend entnommen.

Jedes Transplantat wurde, um repräsentative Proben zu erhalten, in einen oberen, mittleren und unteren Abschnitt geteilt und diese drei Proben wurden für die späteren immunhistochemischen Untersuchungen zur Angiogenese und Gefäßstruktur in Formalin gelagert und anschließend in Paraffin gebettet.

2.6.2. Immunhistochemie

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurde ein Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF, Dako Glostrup Dänemark) sowie der Antikörper Anti- CD31 (Dako Glostrup Dänemark) gewählt. In Vorversuchen wurde die optimale Verdünnung für die Antikörper ermittelt.

2.6.2.1 CD31

CD 31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) ist ein transmembranöses Zell-Adhäsions Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Es wird exprimiert von Endothelzellen, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und einer Unterfamilie von T-Lymphozyten (Feng et al.

2004, Muller et al. 1989). CD 31 weist eine hohe Spezifität und Sensitivität für Endothelzellen auf und gilt als verlässlichster Endothelmarker.

Die immunhistologische CD31 Färbung ist eine sensitive Methode für die Detektion vaskulärer Endothelzellen und Quantifizierung der Angiogenese. Über die Bindung mit CD31 Antikörpern an das gefäßendothel-spezifische Oberflächenantigen CD31 kann die Mikrogefäßdichte eines Gewebeschnittes dargestellt werden. Des Weiteren kann die Expression des transmembranösen Glykoproteins durch Hypoxie (Kalra et al. 1996) und Zytokine wie beispielsweise VEGF stark beeinflusst werden (Romer et al. 1995, Healy et al. 2000).

2.6.2.2 von-Willebrand-Faktor

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein aus Polypeptideinheiten von ca. 220 kDA. VWF wird hauptsächlich von Endothelzellen in Venen, Arterien, Kapillaren und Lymphgefäßen sowie Megakaryozyten exprimiert. In der Endothelzelle wird vWF in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert, um bei Bedarf sezerniert werden zu können (Hannah et al. 2002, Weibel and Palade 1964). Auch in reaktiven und neoplastischen Endothelzellen ist seine Produktion nachweisbar. In der Gerinnungskaskade liegt der vWF als Komplex mit dem Faktor VIII vor. Der vWF ist für die Interaktion zwischen verletztem Endothel und Thrombozyten verantwortlich (Neuhauser et al. 2000, Mannucci 1998). Die Detektion von Gefäßen besitzt eine geringere Sensitivität als mit CD31. Es können aber auch Lymphgefäße zu einem geringen Anteil miterfasst werden (Hasan, Byers and Jayson 2002, Vermeulen et al. 1996) .

Für die Quantifizierung der Mikrogefäßdichte wurde mit dem Mikroskop (Zeiss) bei 200-facher Vergrößerung (Okular 10-fach, Objektiv 20-fach) in einem quadratischen Raster die Anzahl der Gefäße des untersuchten Gewebes gezählt. Pro Schnittpräparat wurden mindestens sechs und höchstens zehn Raster ausgezählt.

2.6.2.3 Verfahren

Bei allen Färbungen wurde das Verfahren der Streptavidin-Biotin Methode (Labelled Strept Avidin Biotin) der Firma Dako (Dako, Glostrup Dänemark) angewandt. Bei diesem Verfahren wird das zu untersuchende Gewebe zuerst mit einem verdünnten primären Antikörper inkubiert. Anschließend findet eine Komplexbildung statt zwischen dem primären Antikörper sowie dem mit Biotin versehenen sekundären Antikörper. Weiterhin dient Streptavidin aufgrund seiner hohen Affinität zu Biotin als Brückenantikörper. Mittels RED Chromogen erfolgt die Sichtbarmachung der Reaktion.

2.6.2.4 Formalin-Fixierung und Paraffin Einbettung

Die Fixierung der entnommenen Gewebetransplantate erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für bis zu 12 Stunden in Formalin (SAV Liquid, Flintsbach). Anschließend wurden die Gewebeproben für eine Stunde gespült. Währenddessen wurde die Entwässerung vorbereitet.

Folgende Lösungen wurden in der entsprechenden Reihenfolge in die vorgesehenen Behälter gefüllt: 3x 70% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 3x absolutes Ethanol, 2x Xylol, 2x Paraffin (60°C). Die gewässerten Paraffinboxen durchliefen über 24h die verschiedenen Stationen. Nach Ablauf der 24 Stunden war der Entwässerungsvorgang beendet und die Proben wurden in der letzten Station, dem Paraffin, bis zur Einbettung für max. 24 Stunden aufbewahrt. Das Einbetten erfolgte in 60°C heißem Paraffin in der Einbettmaschine. Nach dem Erkalten erfolgte eine weitere Kühlung der Paraffinblöcke weiter auf -20°C. Mit Hilfe eines Mikrotoms (UltraCut E, Serie Reichert-Jung von Leica, Wien/Österreich) wurden 1µm dicke Schnitte angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden auf einem Heißwasserbad (40°C) gestreckt, um dann auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte wurden abschließend über Nacht bei 37°C getrocknet, damit sie dann für die Färbungen verwendet werden konnten.

2.6.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt die Routinefärbung für histologische Untersuchungen dar. Mit ihr gelingt eine gute Darstellung des Gewebes wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen.

Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung 20 Minuten in Xylol, 10 Minuten in 100% Ethanol, je 3 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 90%, 80%, 70% Ethanol) inkubiert und 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad (Mayers Hämalaun, Merck, Darmstadt) für 5 Minuten gestellt. Nach Spülen mit destilliertem Wasser und 5 Minuten Inkubation in warmem Leitungswasser färbten sich die Schnitte bläulich. Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung des Zytoplasmas. Hierfür wurden die Objektträger für 8 Minuten in eine 0,1%-ige Eosinlösung (Sigma, München) gestellt und die Farbreaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol entwässert, ein Tropfen Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) auf jedes Präparat getropft und dieses dann mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt.

2.6.2.6 CD31-Färbung

Mit der immunhistologischen CD31-Färbung wird über die Bindung eines Antikörpers an das gefäßendothel-spezifische Oberflächenantigen CD31 (cluster determinant) die Mikrogefäßdichte eines Gewebeschnittes dargestellt.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate 10 Minuten bei 60°C erwärmt, 10 Minuten in Xylol, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70% Ethanol) jeweils 3 Minuten inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Demaskierung des Gewebes erfolgte in Citratpuffer (pH 6,0) durch dreimal 5-minütiges Kochen in der Mikrowelle; nach dem Abkühlen der Schnitte wurden sie 15 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. Mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung (Sigma, München) (10ml 30% Hydrogenperoxide mit 90ml TBS) wurde die endogene Peroxidase blockiert. Dazu wurde die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Präparate aufgebracht und die Objektträger durch zweimaliges Waschen mit TBS 0,025% Triton X-100 und reinem TBS gereinigt. Um unspezifischen Hintergrund zu

blocken, wurde 10%-iges Rabbitserum (Sigma, München) in TBS 0,1% BSA aufgetragen und die Präparate 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper CD31, Goat anti mouse (Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS 0,1% BSA aufpipettiert und die Schnitte für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT belassen. Nach dem Waschen der Schnitte für 10 Minuten in TBS erfolgte die Behandlung der Schnitte mit einer Avidin/Biotin-Blocklösung; hierzu wurde das Gewebe 15 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT mit einer Avidinlösung (Vector, CA, USA) und nach kurzem Waschen mit TBS 15 Minuten mit einer Biotinlösung (Vector, CA, USA) überschichtet. Anschließend wurden die Schnitte 2 Minuten in TBS gespült und der biotinylierte sekundäre Antikörper Rabbit anti Goat (Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde in einer feuchten Kammer bei RT, danach wurden die Präparate 6 Minuten in TBS und 3 Minuten in PBS gewaschen.

Als nächstes wurden die Schnitte mit einem ABC-Komplex (ABC-Kit, Vector, CA, USA) behandelt; dafür wurden jeweils ein Tropfen Avidin DH und biotinyliertes HRP mit 10ml PBS vermischt und die Präparate damit für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen in PBS erfolgte die Färbung mit DAB Lösung (1µl H₂O₂ auf 500µl DAB, Dako Cytomation, CA, USA). Hierfür wurden die Objektträger mit jeweils 100µl der DAB Lösung überschichtet und bis zur gewünschten Farbentwicklung belassen, maximal für 20 Minuten. Die Reaktion wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 30 Sekunden gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in warmem Leitungswasser 4 Minuten gebläut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckt.

2.6.2.7 Von-Willebrand-Faktor Färbung

Der von-Willebrand-Faktor war von besonderem Interesse in dieser Arbeit, da dieses Protein in der subendothelialen Matrix von Blutgefäßen sowie als größtes Protein im Plasma vorhanden ist. Dadurch ist es möglich, Gefäße immunhistologisch anzufärben.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate bei 60°C für 15 Minuten erwärmt, 6 Minuten in Xylol und je 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Ethanol) inkubiert und 3 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Demaskierung durch 20 Minuten Wasserbad bei 97 Grad Celsius in der Dako Target Retrieval Solution, dann wurden die Präparate 20 Minuten abgekühlt und 1 Minute in PBS gespült. Um unspezifischen Hintergrund zu blocken, wurden die Präparate mit Blocking Reagenz (1ml PBS und 30µl Goatserum) für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde dem Objektträger der primäre Antikörper Rabbit (1:200) (Biomedica, CA, USA) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal in PBS für 5 Minuten gespült. Dann wurde der sekundäre Antikörper Goat anti Rabbit-HRP (Jackson, Maine, USA) in einer Verdünnung von 1:200 auf die Schnitte aufgebracht und diese eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Streptavidin-Lösung vorbereitet (1 ml PBS und 10µl Lösung A mit 10µl Lösung B des Vectastain-Kits). Nach einer Stunde erfolgte die dreimalige Spülung in PBS, sodann die Applikation der Streptavidinlösung und Inkubation für 45 Minuten. Anschließend erfolgte die dreimalige Spülung in PBS für jeweils 5 Minuten. Nach dem Auftauen von DAB aus dem Eisschrank wurde 1µl H₂O₂ auf 500µl DAB gegeben. DAB wurde für 8 Minuten auf die Schnitte inkubiert, dann in Aqua destillata gespült. Daraufhin erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Merck, Darmstadt) für 2 Minuten. Die Farbentwicklung geschah unter fließendem Leitungswasser nach etwa 10 Minuten. Zum Abschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg) und einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) bedeckt.

2.7 Experimentelles Protokoll

2.7.1 Versuchsmodell

2.7.1.1 Gruppe I epigastrische Lappentransplantate

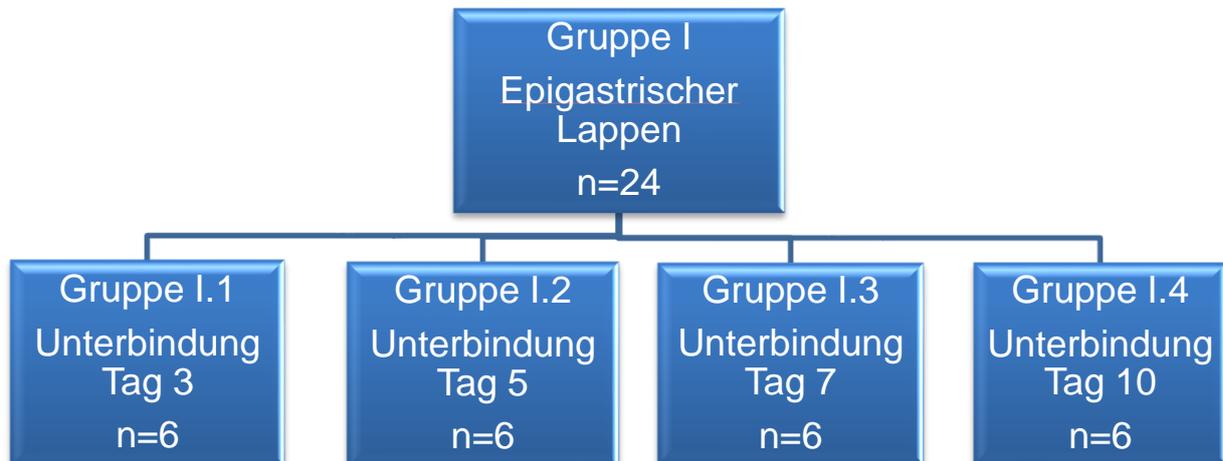


Abbildung 11: Darstellung der Gruppeneinteilung Gruppe I

In der Gruppe I wurde der Einfluss der Durchblutung des epigastrischen Lappentransplantats über die A./V. epigastrica superficialis zu vier verschiedenen Zeitpunkten getestet. Der epigastrische Lappen wurde an insgesamt 24 Wistar-Ratten wie oben beschrieben vollständig gehoben. Jeweils 10 Tage (Gruppe I.4, n=6), 7 Tage (Gruppe I.3, n=6), 5 Tage (Gruppe I.2, n=6) oder 3 Tage (Gruppe I.1, n=6) nach der Lappenhebung erfolgte die Ligation des Gefäßstiels. Dabei wurde in kurzer Isoflurannarkose über einen ca. 1cm langen Zugang der Gefäßstiel unterbunden und die Lappeneinheilung anhand der Nekrosezone gemessen.

In der Kontrollgruppe (n=6) wurde das epigastrische Transplantat, wie beschrieben, vollständig gehoben. Der Gefäßstiel mit A./V. epigastrica superficialis und den Femoralgefäßen wurde freipräpariert, jedoch geschont. Im Anschluss wurde das

Transplantat wieder in sein Wundbett zurückverlagert und eingenäht. Ziel der Kontrollgruppe war es zu zeigen, dass der epigastrische Lappen in der verwendeten Größe nach vollständiger Durchtrennung aller Perforatoren und ohne VEGF Applikation, allein durch den Gefäßstiel perfundiert einheilen kann.

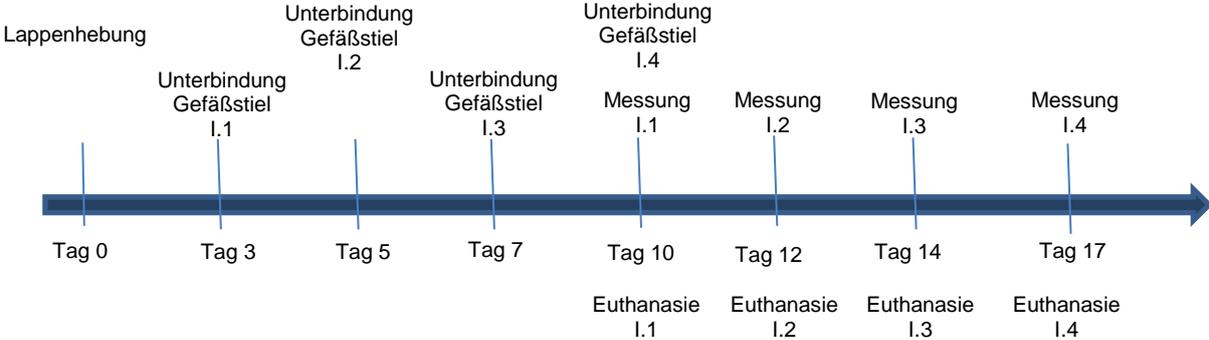


Abbildung 12: Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe I.

2.7.1.2 Gruppe I.v epigastrische Lappentransplantate und VEGF Applikation

In der Gruppe I.v erfolgte die analoge Vorgehensweise der Lappenhebung und Zeitpunkt der Lappenstieldurchtrennung. Zusätzlich wurde der Einfluss des Applikationszeitpunktes von VEGF untersucht.

In dieser Gruppe wurden 144 Wistar-Ratten untersucht. Dabei erfolgte eine Unterteilung in 4 Untergruppen, in denen anhand des Zeitpunktes der VEGF Applikation unterschieden wurde sowie jeweils eine Kontrollgruppe: Es erfolgte prä-, post-, sowie prä- und postoperativ die Injektion von jeweils 20µl VEGF (hVEGF165, PeproTech, Hamburg, Deutschland) zirkulär um das Transplantat sowie subdermal in das Wundbett. Diese 4 Gruppen wurden wiederum in 4 Subgruppen aufgeteilt, die sich vom Zeitpunkt der Lappenstieldurchtrennung unterschieden. Es erfolgte analog zu Gruppe I eine Durchtrennung des Lappenstiels nach 10, 7, 5 oder 3 Tagen (Abbildung 13).

In den Gruppen I.1.v- I.4.v wurde VEGF prä- sowie postoperativ appliziert. Gruppe I.1.v (n=9) Unterbindung nach 3 Tagen, I.2.v (n=9) Unterbindung nach 5 Tagen, I.3.v (n=9) Unterbindung nach 7 Tagen, I.4.v (n=9) Unterbindung nach 10 Tagen.

In den Gruppen I.1.1.v- I.4.1.v wurde VEGF unmittelbar präoperativ appliziert. Gruppe I.1.1.v (n=9) Unterbindung nach 3 Tagen, I.2.1.v (n=9) Unterbindung nach 5 Tagen, I.3.1.v (n=9) Unterbindung nach 7 Tagen, I.4.1.v (n=9) Unterbindung nach 10 Tagen.

In Gruppe I.1.2.v- I.4.2.v wurde VEGF unmittelbar postoperativ appliziert. Gruppe I.1.2.v (n=9) Unterbindung nach 3 Tagen, I.2.2.v (n=9) Unterbindung nach 5 Tagen, I.3.2.v (n=9) Unterbindung nach 7 Tagen, I.4.2.v (n=9) Unterbindung nach 10 Tagen.

In der Kontrollgruppe erfolgten nur die Lappenhebungen und Unterbindungen des Lappenstiels nach jeweils 3, 5, 7 oder 10 Tagen analog der Gruppe I, aber keine VEGF Applikation.

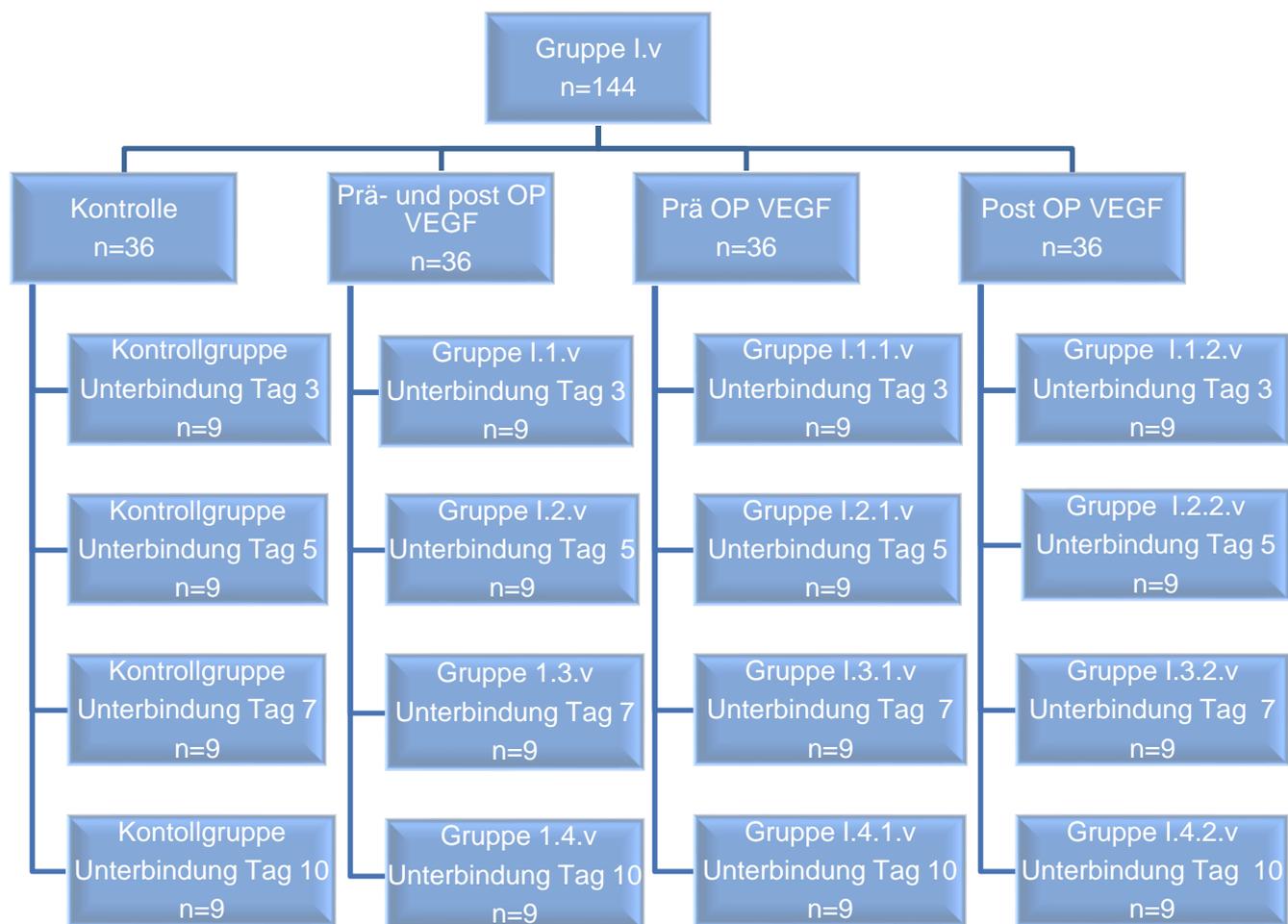


Abbildung 13: Darstellung der Gruppeneinteilung Gruppe 1.v.

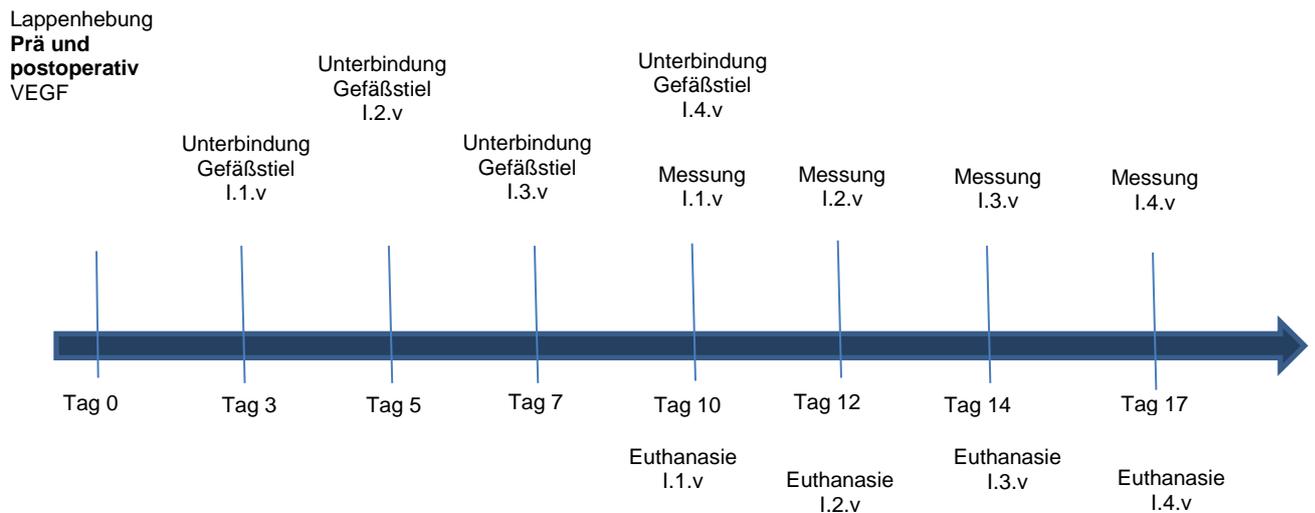


Abbildung 14: Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe I mit VEGF- Applikation.

2.7.1.3 Gruppe II Perforatorlappen

In der Gruppe II der Perforatorlappen, wurden 36 Wistar Ratten in jeweils 3 verschiedenen Situationen untersucht:

Die Perforansgefäße der Transplantate wurden auf 3-4 reduziert (Gruppe II.1 n=6), auf 2 Perforatoren (Gruppe II.2 n=6) oder 1 Perforator (Gruppe II.3 n=6) reduziert und ebenfalls anhand der Nekrosezone gemessen und verglichen.

2.7.1.4 Gruppe II.v Perforatorlappen und VEGF Applikation

in der Gruppe II.v wurde analog zur Gruppe II die Perforansgefäße auf 3-4 reduziert (Gruppe II.1v, n=6) auf 2 Perforatoren (Gruppe II.2v, n=6) sowie auf 1 Perforator

reduziert (Gruppe II.3v, n=6), zusätzlich wurde präoperativ 20 µl VEGF (hVEGF 165, PeproTech, Hamburg, Germany) subdermal, zirkulär entlang des Transplantatbettes injiziert.

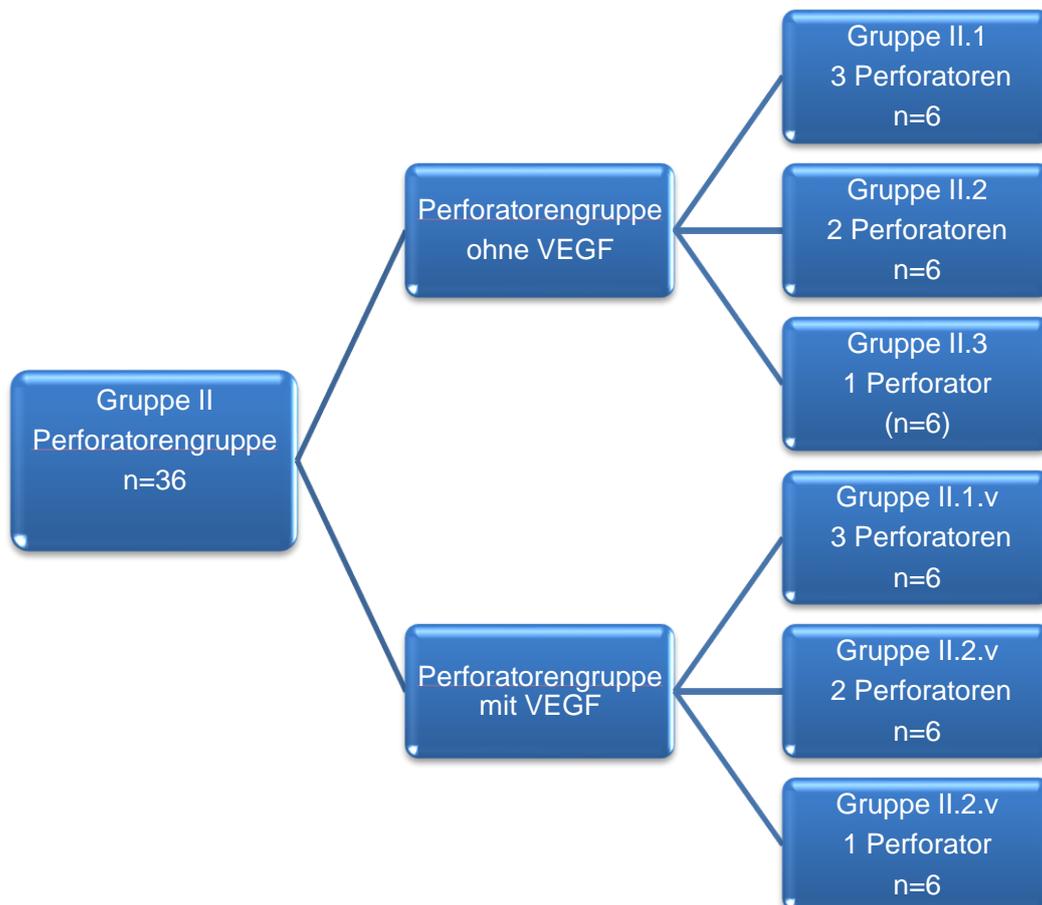


Abbildung 15: Darstellung Gruppeneinteilung Gruppe II und Gruppe IIv.

Gruppe II+ II.v

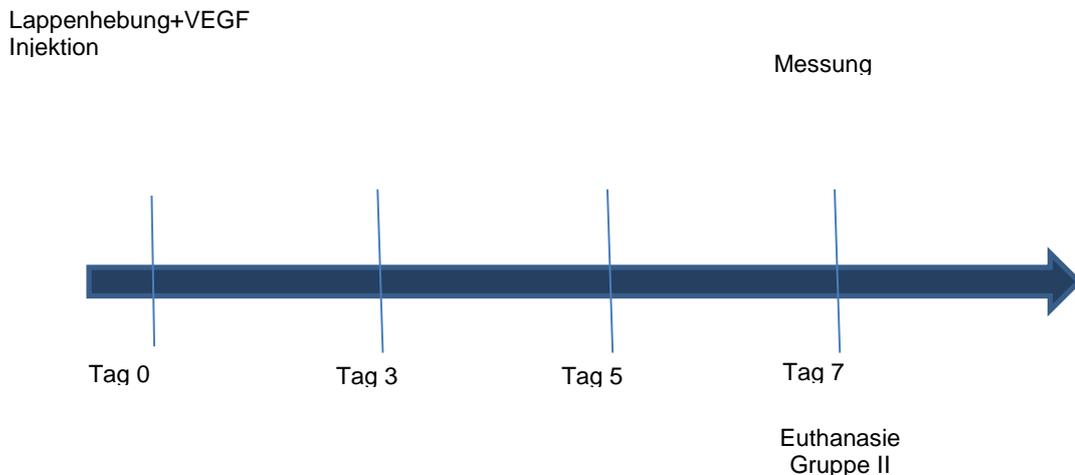


Abbildung 16: Darstellung Versuchsablauf Gruppe II und II.v.

2.8 Auswertung und Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurden das Statistikprogramm "Statistical Package for the Social Science" (IMB SPSS für Mac, release 18.0.0.2010, Spss Inc, Chicago IL; USA) verwendet. Parametrische Daten wurden durch den Mittelwert und die Standardabweichung abgebildet, nicht-parametrische Daten durch den Median und die Range (Min-Max) mit Excel (MS Excel® 14.4.1. Microsoft Corp., Redmond, USA) berechnet. *P*-Werte $< 0,05$ werden als statistisch signifikant, darüber liegende Werte als statistisch nicht signifikant, darunterliegende Werte als statistisch nicht signifikant angesehen. Das Konfidenzintervall wurde mit 95% angegeben. Als ein statistisches Testverfahren wurden der t-Test gewählt, wenn die Ausgangsdaten einer Normalverteilung folgten. Der t-Test für zwei verbundene Stichproben wurde verwendet, um z.B. die Bereiche der Lappennekrose zu vergleichen. Die verschiedenen Werte der Messzeitpunkte präoperativ, perioperativ und postoperativ sowie nach Stielunterbindung und 1 Woche nach Unterbindung wurden mittels multipler linearer Regressionsanalyse spezifiziert und anhand der gemessenen Parameter (Hämoglobinoxygenierung, Hämoglobinkonzentration, Blutfluss und Blutgeschwindigkeit) analysiert. Die multiple lineare Regressionsanalyse wird ebenfalls verwendet, um Faktoren wie Anzahl der Perforatoren und VEGF-Applikation,

die mit der Nekrosegröße assoziiert sein können, zu untersuchen. Für die Analyse der Nekroserate wurde der Mann-Whitney-Unabhängigkeitstest verwendet um die abhängige Variable Nekrosegröße durch unabhängige Variablen wie die Anzahl der Perforatoren oder VEGF zu bestimmen. Mit der Spearman-Korrelation wurde die Lappennekrose mit den Werten der O2C Messung korreliert. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde ebenfalls als nicht-parametrisches Verfahren der Mann-Whitney Unabhängigkeitstest angewandt.

3. Ergebnisse

3.1 Epigastrische Lappentransplantate

3.1.1 Flächenauswertung des epigastrischen Lappentransplantates abhängig vom Ligationszeitpunkt

Die Nekrosegröße betrug bei Ligation des Lappenstiels nach 3 Tagen $62,77 \pm 1,71\%$ [44,3-100%], nach 5 Tagen $16,26 \pm 0,86\%$ [3,66-29,92%], nach 7 Tagen $2,88 \pm 0,14\%$ [1,06-5,95%] und nach 10 Tagen $1,64 \pm 0,16\%$ [0,16-5,27].

Der Unterschied zwischen den Gruppen war im t-Test bezüglich der Nekroseraten zwischen Tag 3 und 5, 3 und 7 sowie 5 und 7 hoch signifikant ($p < 0,0001$). Der Unterschied bezüglich des Nekroseareals zu der Gruppe, bei welcher der Gefäßstiel am 10. Tag durchtrennt wurde war nicht statistisch signifikant ($p = 0,257$) (Abbildung 17).

Die Evaluation der Autonomisierung der epigastrischen Lappentransplantate an der Ratte zeigte, dass die Abhängigkeit vom Lappenstiel in dem verwendeten Modell limitiert ist und die Nekrosezone mit zunehmender Zeitdauer bis zur Durchtrennung des Gefäßstiels deutlich abnimmt.

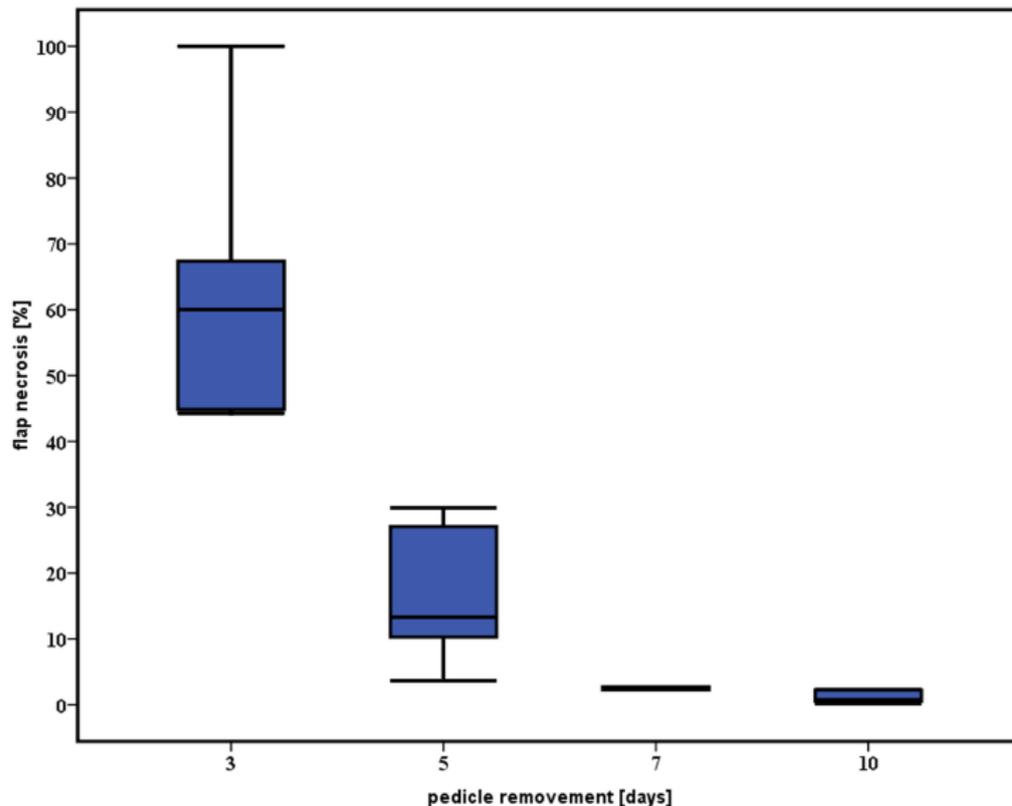


Abbildung 17: Darstellung der planimetrisch gemessenen Nekrosezonen in Abhängigkeit von der Stieldurchtrennung des Gewebestiels nach erfolgter Transplantathebung an Tag 3, 5, 7 und 10. Die Unterschiede der Nekrosegröße waren signifikant mit Ausnahme der 7-Tages-Gruppe mit der 10-Tages-Gruppe ($p < 0.05$, $n = 24$).

3.1.2 Gruppe I - O2C Messung

Die durch das perioperative Monitoringverfahren mit dem O2C Gerät gemessenen Perfusionswerte, entsprechend den unterschiedlichen Ligationszeitpunkten (präoperativ, nach Ligation und eine Woche nach Ligation), sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Messungen zeigten eine Korrelation zu der Stoffwechsellage und der Entwicklung von Nekrosezonen (Abbildung 18).

Die Werte von Hb, Flow und Velocity stellten sich bei dem präoperativen sowie postoperativen Messungen als verlässliche und signifikante Vorhersagewerte für die

Entwicklung einer Nekrose heraus ($p < 0,0001$). SO₂ und Flow waren zum Zeitpunkt der Ligation signifikant entscheidend für die Transplantatentwicklung und die konsekutive Entwicklung einer Nekrose ($p < 0,0001$). Diese Werte konnten in der durchgeführten Arbeit statistisch als Richtwerte für prognostische Voraussagen verifiziert werden (Tabelle 1).

Die prozentuale Änderung der Messwerte von SO₂, Hb, Flow und Velocity im Vergleich der verschiedenen Messzeitpunkte präoperativ und nach einer Woche, sowie nach Ligation und nach einer Woche zeigten in der multiplen Regressionsanalyse eine Korrelation mit der Entwicklung einer Nekrose (Tabelle 3). Als signifikante Faktoren zur Entwicklung einer Lappennekrose zeigten sich dabei die prozentuale Änderung der Werte von SO₂ ($p < 0,0001$), Flow ($p < 0,0001$) und Velocity ($p = 0,001$) bei der präoperativen Messung im Vergleich zu den Messungen nach Ligation (Tabelle 2, Abbildung 19).

Parameter	Gruppe	Kontrolle	Vor Ligatur	Nach Ligatur	Nach einer Woche
SO₂ [%]	3 Tage	59 ± 8	37 ± 1	2 ± 1	25 ± 2
	5 Tage		39 ± 1	6 ± 1	44 ± 2
	7 Tage		40 ± 1	21 ± 2	36 ± 1
	10 Tage		35 ± 1	21 ± 1	36 ± 1
Hb [AU]	3 Tage	62 ± 9	76 ± 1	70 ± 1	50 ± 2
	5 Tage		70 ± 1	68 ± 1	58 ± 1
	7 Tage		63 ± 1	62 ± 1	64 ± 1
	10 Tage		62 ± 1	65 ± 2	64 ± 1
Flow [AU]	3 Tage	150 ± 38	98 ± 4	56 ± 2	113 ± 7
	5 Tage		197 ± 8	73 ± 3	97 ± 2
	7 Tage		158 ± 4	85 ± 2	105 ± 5
	10 Tage		119 ± 3	92 ± 3	114 ± 3
Velocity [AU]	3 Tage	25 ± 5	19 ± 1	17 ± 1	19 ± 1
	5 Tage		31 ± 1	18 ± 1	19 ± 1
	7 Tage		26 ± 1	19 ± 1	21 ± 1
	10 Tage		20 ± 1	19 ± 1	21 ± 1

SO₂ = Sauerstoffsättigung, Hb = Hämoglobinspiegel, AU = arbitrary units

Tabelle 1: Ergebnisse der Laser-Gewebespektroskopie vor und nach Hebung des epigastrischen Transplantates sowie nach Stielunterbindung zur Testung der Autonomisierung.

Zeitpunkt	R ²	Signifikante Variablen	p-Wert	Unstandardisierter Regressionskoeffizient	95% CI
Vor Lappenhebung	0,17	Hb	<0,0001	0,837	0,632 bis 1,043
		flow	<0,0001	- 0,209	- 0,302 bis - 0,116
		velocity	0,001	1,286	0,537 bis 2,034
Nach Ligatur	0,36	SO ₂	<0,0001	- 0,898	- 1,039 bis - 0,757
		flow	<0,0001	- 0,298	- 0,360 bis - 0,237
Nach einer Woche	0,52	Hb	<0,0001	- 0,875	- 1,011 bis - 0,740
		flow	<0,0001	0,551	0,445 bis 0,658
		velocity	<0,0001	- 3,407	- 4,139 bis - 2,675

R²=Determinationskoeffizient, SO₂=Sauerstoffsättigung, Hb=Hämoglobin, CI =Konfidenzintervall

Tabelle 2: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der perioperativen Werte gemessen durch die Laser-Doppler-Spektroskopie auf die Autonomisierung und Darstellung der prognostischen Bedeutung.

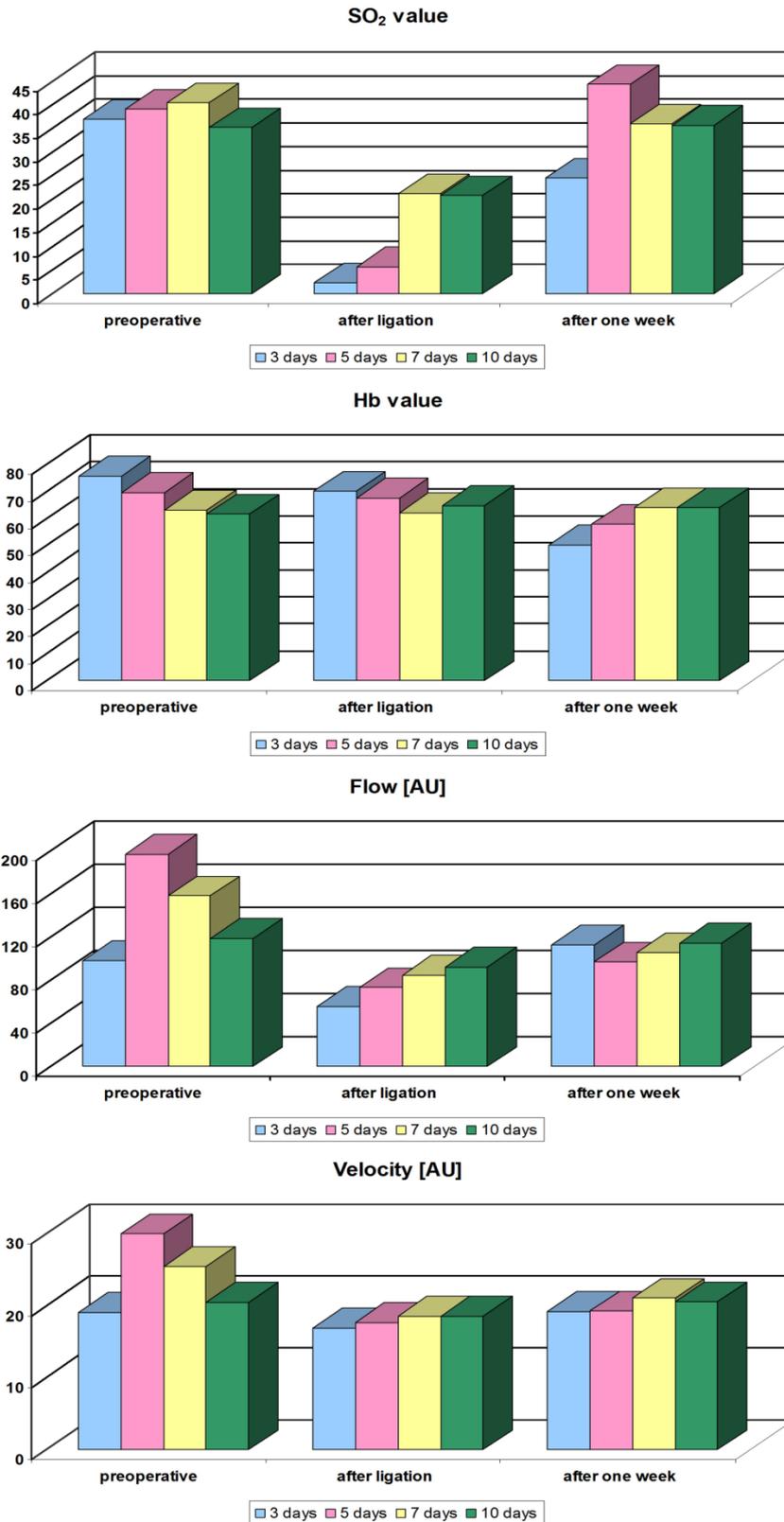


Abbildung 18: Darstellung der gemessenen Werte durch die Laser-Doppler-Spektroskopie zu den Zeitpunkten präoperativ, nach Stielunterbindung sowie eine Woche nach Stielunterbindung.

Time period	R^2	Significant factors	P-value	Unstandardized regression coefficient	95% CI
Before flap raising–after ligation	0.26	SO ₂	<0.0001	-0.306	-0.360 to -0.251
		Flow	<0.0001	-0.264	-0.370 to -0.157
		Velocity	0.001	0.255	0.107 to 0.402
Preoperative–after 1 week	0.62	SO ₂	<0.0001	0.131	0.094 to 0.169
		Hb	<0.0001	-0.749	-0.828 to -0.669
		Flow	<0.0001	0.231	0.172 to 0.289
		Velocity	<0.0001	-0.249	-0.347 to -0.150
After ligation–after 1 week	0.35	SO ₂	<0.0001	0.006	0.004 to 0.008
		Hb	<0.0001	-0.105	-0.137 to -0.073
		Flow	<0.0001	0.089	0.073 to 0.105
		Velocity	<0.0001	-0.198	-0.249 to -0.147

Tabelle 3: Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse bezogen auf die zeitlichen Intervalle zwischen den perioperativen Messungen unter Berücksichtigung der Messwerte auf die Entwicklung von Hautnekrosen.

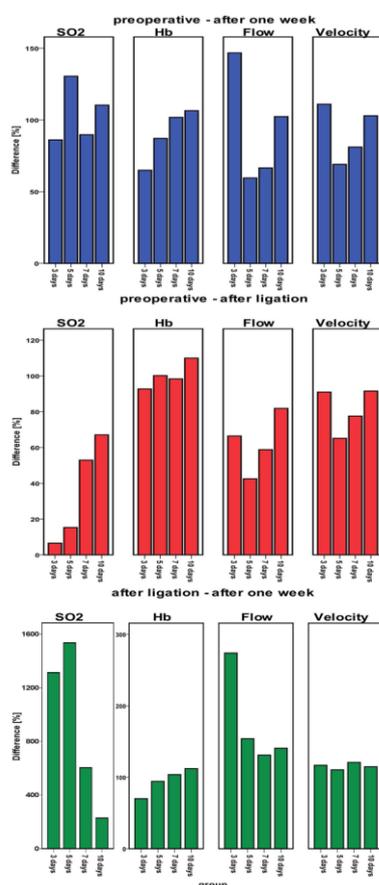


Abbildung 19: Prozentuale Entwicklung der Werte zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der O2C Messungen. Die Grafik verdeutlicht die Änderung der Werte: 100% entspricht einem gleichgebliebenen Wert, eine Erhöhung der Werte bedeutet eine Zunahme der Differenz der Werte zwischen den Messungen während eine Verminderung für eine prozentuale Abnahme spricht.

3.1.3 Gruppe 1- Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung der Lappentransplantate zeigte nach HE-Färbung eine regelrechte Schichtung der Hautarchitektur in den vitalen Arealen sowie eine akute inflammatorische Reaktion wie Neutrophileninfiltration ins intestinale Gewebe. Besonders deutlich zeigt sich die Infiltration von Entzündungszellen entlang der Grenze von vitalem zu nekrotischem Gewebe in der Gruppe der Stielunterbindung nach drei Tagen. Die nekrotischen und ischämischen Areale zeichnen sich hier neben einer lymphozytären Infiltration der subkutanen Gewebestrukturen auch durch eine Unterbrechung der Keratinschicht sowie einer myozytären Nekrosezone mit einem konsekutiven Verlust dieser Gewebsschicht aus (Abbildung 20-23).

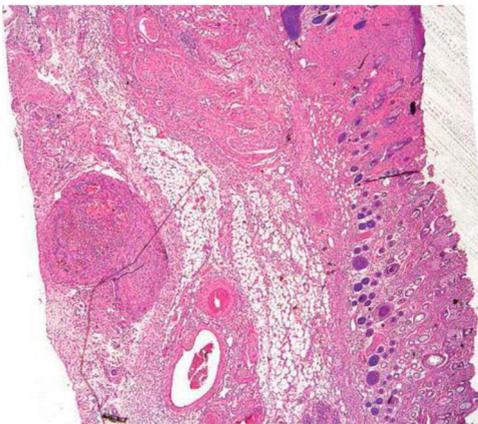


Abbildung 20: Stielunterbindung nach 3 Tagen

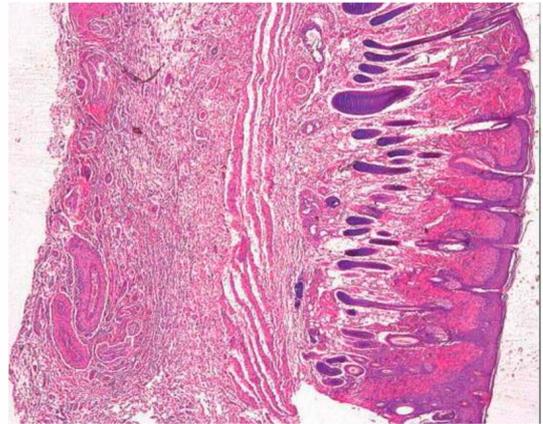


Abbildung 21: Stielunterbindung nach 5 Tagen

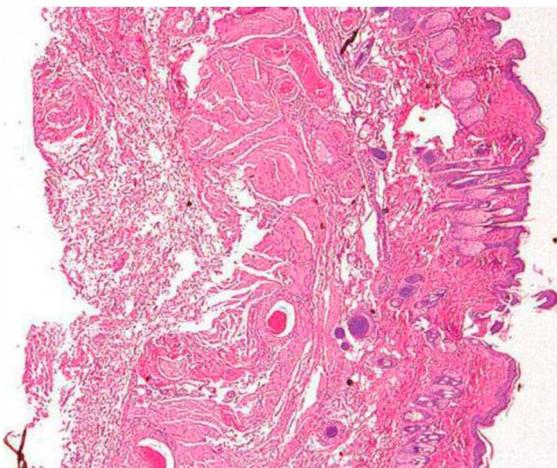


Abbildung 22: Stielunterbindung nach 7 Tagen

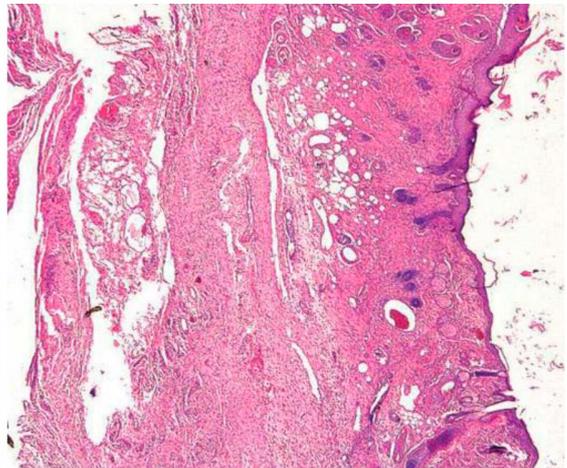


Abbildung 23: Stielunterbindung nach 10 Tagen

3.2 Einfluss von VEGF auf epigastrische Lappentransplantate Gruppe I.v

3.2.1 Flächenauswertung der epigastrischen Lappentransplantate, abhängig vom Ligationszeitpunkt und dem VEGF-Applikationszeitpunkt

Die Gewebetransplantate der Tiere, denen 20µl VEGF appliziert wurde, zeigten eine signifikant frühere Autonomisierung im Vergleich mit den Gewebetransplantaten ohne VEGF Applikation. Dabei konnten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Gruppe ohne VEGF) und den Gruppen, in denen die Unterbindung des Lappenstiels am dritten und fünften Tag nach Lappenhebung erfolgte, gezeigt werden. Kein Unterschied in der Größe der Nekrosezone zwischen der Gruppe mit und ohne VEGF-Applikation war bei der Ligation nach 7 und 10 Tagen sichtbar.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Applikationszeitpunktes von VEGF untersucht. Hierbei konnte zwischen den verschiedenen Applikationsformen (präoperativ, postoperativ sowie prä- und postoperativ) jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4, Abbildung 24). Auch die mehrfache Applikation von VEGF führte zu keiner signifikanten Nekroseentwicklung.

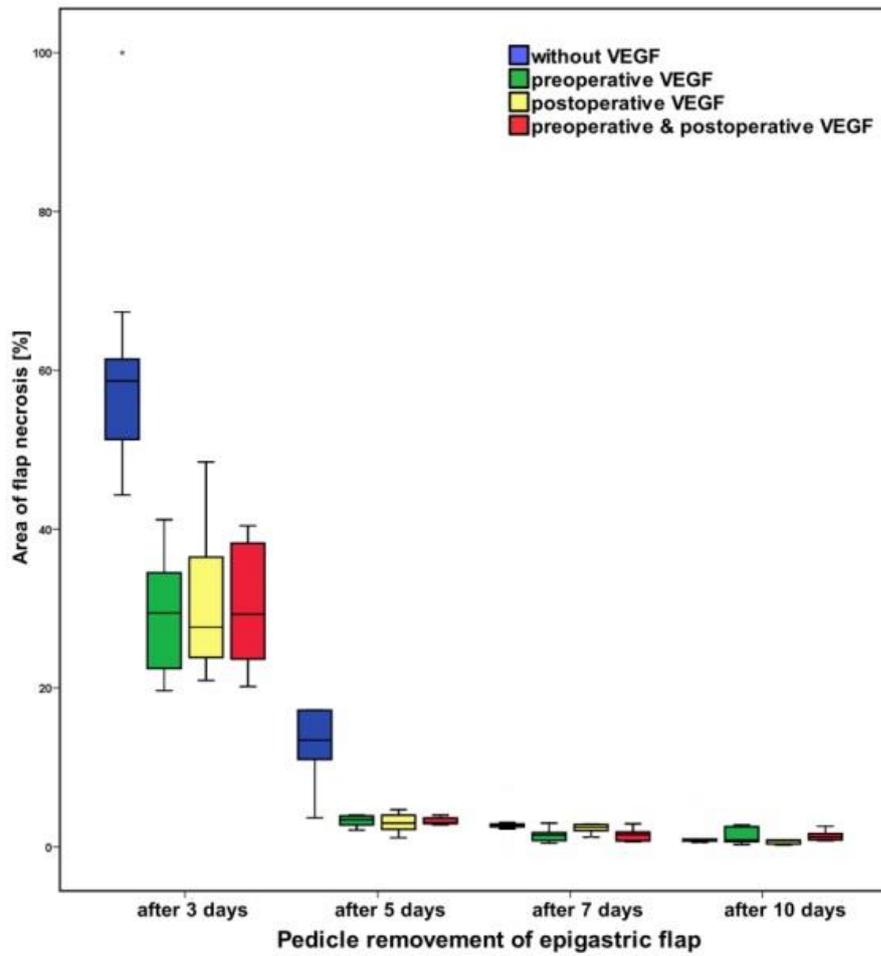


Abbildung 20: Darstellung der Nekrosezone in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der VEGF-Applikation.

Time of ligation [days]	VEGF protocol	Amount of flap necrosis [%]	p-value	95% CI
3	without VEGF	60.38		
	preoperative	29.37	<0.0001 *	18.04 to 43.99
	postoperative	30.78	<0.0001 *	16.2 to 43.01
	preoperative & postoperative	30.65	<0.0001 *	16.73 to 42.73
5	without VEGF	15.61		
	preoperative	3.29	<0.0001 *	6.46 to 18.19
	postoperative	3.07	<0.0001 *	6.65 to 18.45
	preoperative & postoperative	3.20	0.004 *	6.56 to 18.26
7	without VEGF	2.86		
	preoperative	1.55	0.054	-0.02 to 2.41
	postoperative	2.20	0.20	-0.39 to 1.71
	preoperative & postoperative	1.52	0.051	-0.01 to 2.45
10	without VEGF	1.38		
	preoperative	1.41	0.96	-1.34 to 1.29
	postoperative	0.84	0.36	-0.68 to 1.76
	preoperative & postoperative	1.38	0.99	-1.19 to 1.20

Tabelle 4: Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit verschiedenem Zeitpunkt der VEGF-Applikation.

3.2.2. Gruppe I.v - O2C Messungen

Der Effekt der Autonomisierung und Auswertung der Größe der Nekrosezonen konnte auch mit den durchgeführten Messungen mittels O2C statistisch belegt werden (Abbildung 25). Zwischen den Gruppen der verschiedenen VEGF Applikationszeitpunkten konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Auswertungen der O2C Messungen zeigten anhand der multiplen linearen Regressionsanalyse, dass die Werte der präoperativen Messungen von Hb ($p < 0,0001$, 95% KI -0,32 bis -0,13), Flow ($p < 0,0001$, 95% KI -0.32 bis -0,13) und Velocity

($p < 0,0001$, 95% KI 0,48 bis 1,89) einen Einfluss auf die spätere Entwicklung der Nekrosegröße hatten. Zum Messzeitpunkt nach Lappenstielunterbindung waren SO₂ ($p < 0,0001$, 95% KI -1,12 bis -0,83) und Flow ($p < 0,0001$, 95% KI -0,38 bis -0,26) als prognostische Faktoren bezüglich der entwickelnden Nekrosezonen maßgebend.

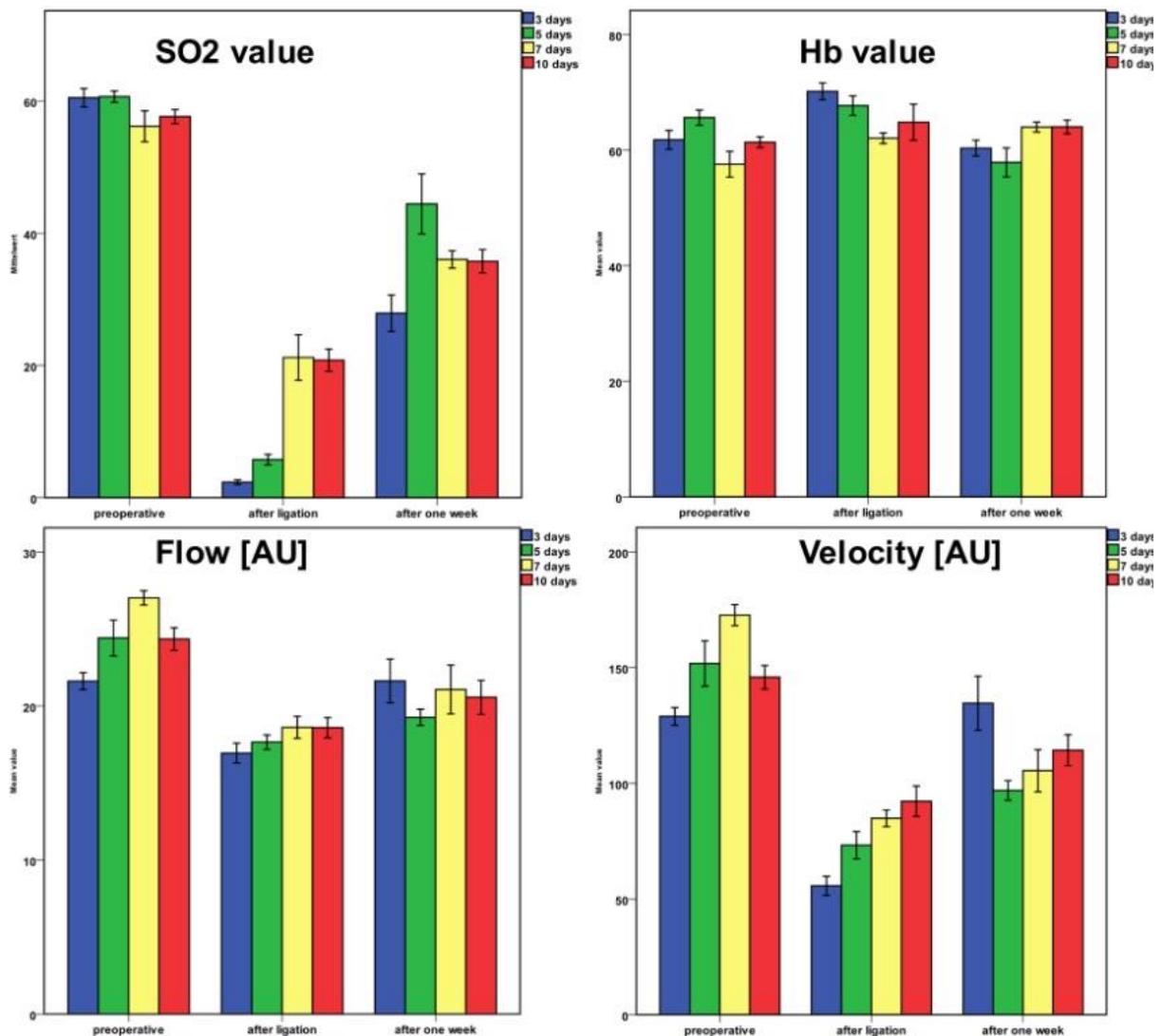


Abbildung 21: Darstellung der gemessenen O₂C-Werte der verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der VEGF-Applikation.

3.2.3 Gruppe I.v - Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Die Transplantate wurden des Weiteren histologisch und immunhistochemisch untersucht. Als Fragestellung wurde zu Grunde gelegt, ob die Applikation von VEGF einen Einfluss auf die Bildung von zusätzlichen Blutgefäßen hat und ob ein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen besteht.

Die Gewebe der Transplantate aus der VEGF Gruppe zeigten in der HE-Färbung in allen Gruppen Anzeichen einer akuten Entzündungsreaktion mit Neutrophilen- und Monozyteneinwanderung. Auch beginnende Myolysen und eine myozytäre Nekrosezone zeichneten sich in den meisten Bereichen der nekrotischen Areale ab. Ebenfalls war die Einwanderung inflammatorischer Zellen in der Gruppe der Stieldurchtrennung nach 3 Tagen am deutlichsten zu erkennen. Innerhalb der verschiedenen Gruppen der mit VEGF behandelten Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in den VEGF Gruppen deutlich mehr Granulationsgewebe zu erkennen (Abbildung 26).

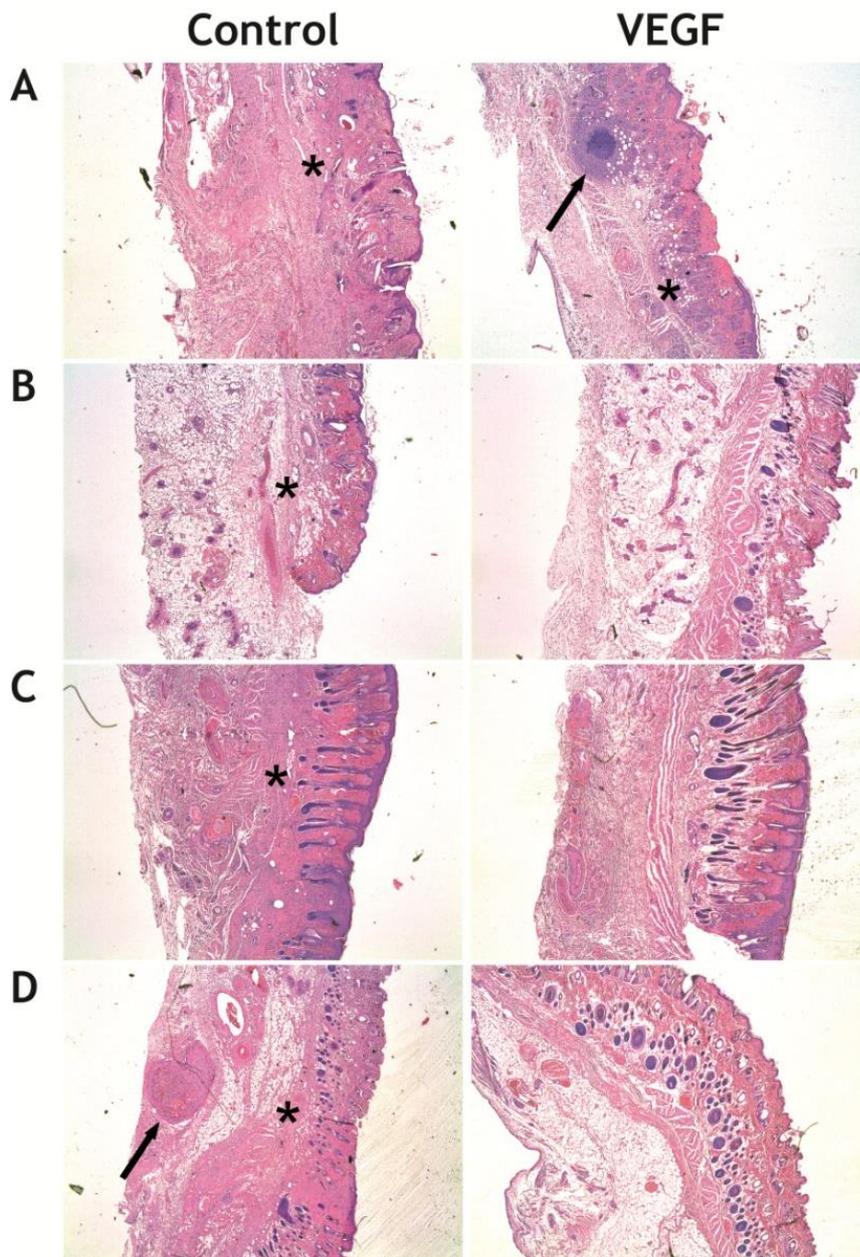


Abbildung 22: Darstellung der histologischen Analyse der Gewebetransplantate. Die Pfeile markieren lymphozytäre Infiltrationen, die Sterne Myonekrosen innerhalb des Transplantates.

In dem entnommenen Gewebe zeichnete sich in den VEGF Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Mikrogefäßdichte ab. Insbesondere in den perifollikulären Arealen zeigte sich eine vermehrte Anfärbung mit CD31-Antikörpern im Vergleich zu vWF-Antikörpern. Nach statistischer Auswertung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ohne VEGF und mit Applikation des angiogenetischen Faktors festgestellt werden. Zwischen den VEGF Gruppen untereinander zeigte sich ein geringeres Signifikanzniveau. Die postoperative Applikation von VEGF zeigte keinen Unterschied zu der Gruppe mit präoperativer und postoperativer Injektion von VEGF (Tabelle 5, Tabelle 6, Abbildung 27).

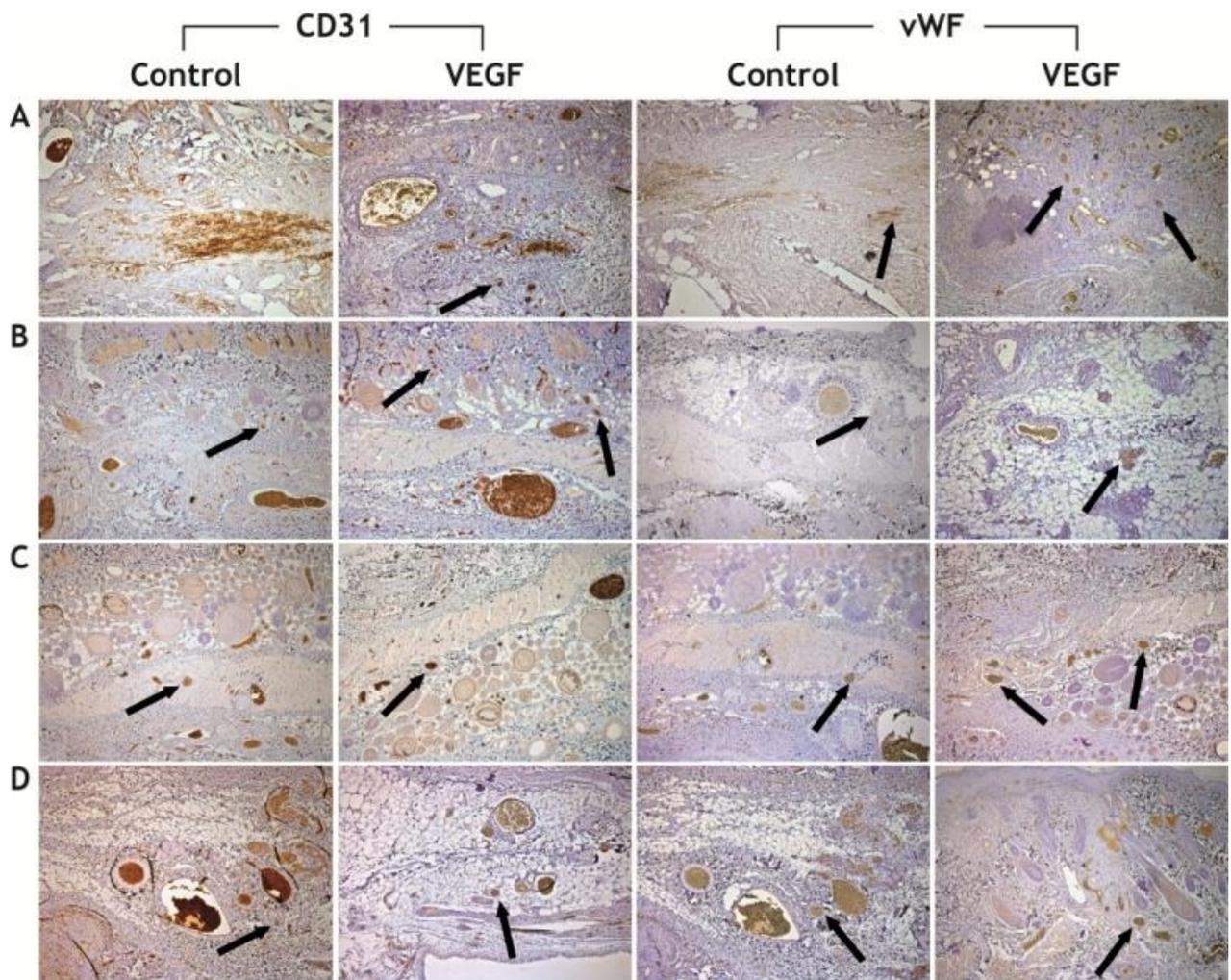


Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung der verschiedenen Gewebetransplantate exemplarisch für die verschiedenen Gruppen. Die Pfeile weisen auf die angefärbten Mikrogefäße hin.

pedicle ligation [days]	VEGF protocol	p-value		
		preoperative	postoperative	preoperative & postoperative
3	without VEGF	0.024*	<0.0001*	0.008*
	Preoperative	X	0.014*	0.395
	Postoperative	X	X	0.09
5	without VEGF	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
	Preoperative	X	0.08	0.08
	Postoperative	X	X	1.0
7	without VEGF	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
	Preoperative	X	0.141	0.04*
	Postoperative	X	X	0.363
10	without VEGF	0.799	0.022*	0.003*
	Preoperative	X	0.57	0.01*
	Postoperative	X	X	0.174

Tabelle 5: Evaluation der Unterschiede der Mikrogefäßdichte zwischen den verschiedenen Gruppen (AMC/Field/(n/mm²))

Group	Control group	VEGF preoperative	VEGF postoperative	VEGF preoperative and postoperative
Time post OP				
3 days	4.5 ± 1.05	6.0 ± 0.89	7.67 ± 1.03	6.5 ± 1.05
5 days	6.5 ± 1.52	13.5 ± 2.17	11.5 ± 1.05	11.5 ± 1.05
7 days	6.83 ± 1.17	13.2 ± 0.75	12.33 ± 1.03	11.67 ± 1.37
10 days	8.67 ± 1.03	8.83 ± 1.17	10.0 ± 0.63	10.5 ± 0.55

Tabelle 6: Gefäßdichte der epigastrischen Lappen nach immunhistochemischer Färbung von CD 31 und vWF

3.3 Perforatortransplantate

3.3.1 Flächenauswertung der Perforatorengruppe abhängig von der Anzahl der Perforatoren

Die Perforatoren, die die überdimensionierten epigastrischen Lappentransplantate versorgen, zeigten nach Hebung der Gewebetransplantate unterschiedlich große Nekroseflächen, abhängig von der Anzahl der durchbluteten Perforatoren. Je mehr Perforatoren in den Lappen eingeschlossen wurden, desto größer war der Anteil des vitalen Gewebes, beziehungsweise desto geringer war die Größe der Nekrosezone. Dieser Unterschied war statistisch in allen Gruppen hochsignifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 28 und 29).

Die Nekrosezone betrug bei Erhalt von 3-4 Perforatoren $14,7 \pm 6,3\%$ [7,1-24,3%], bei 2 Perforatoren $31,4 \pm 6,5\%$ [24,3-42,0%] und bei Reduktion auf einen Perforator lag die Nekrosezone bei $72,2 \pm 6,2\%$ [65,6-82,7%] (Tabelle 7).

Die Hypothese, dass bei kontinuierlicher Durchblutung eine Reduktion der Versorgung toleriert wird, konnte nur teilweise bestätigt werden, da die zu starke Reduktion der

Versorgung eine zunehmende, nicht proportionale, sondern exponentielle Nekroseausbildung zur Folge hatte (Abbildung 29).



Abbildung 24: Gruppe ohne VEGF: Nekrosezonen bei den Perforans-basierten epigastrischen Transplantaten der Ratte. Die Anzahl der Perforatoren wurde zunächst bei 3-4 belassen (links), auf 2 (beide Bilder in der Mitte) und 1 (rechts) reduziert.

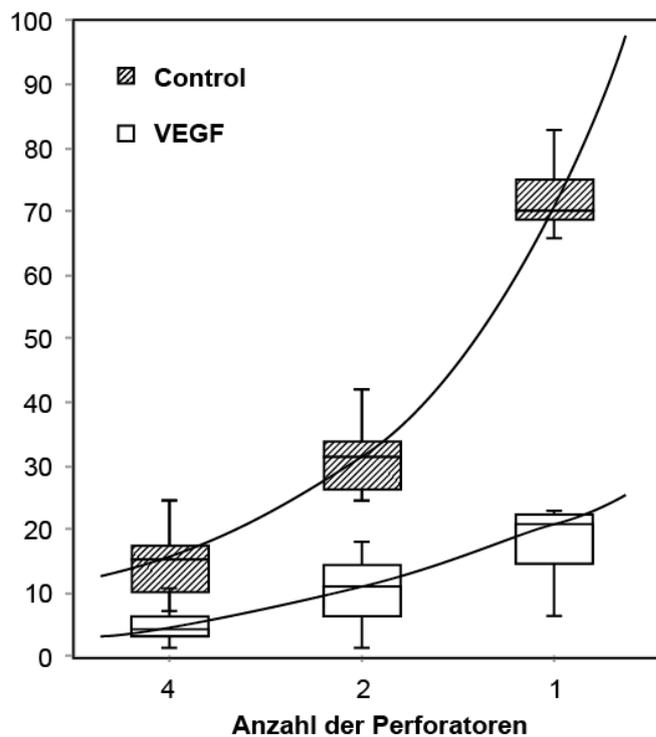


Abbildung 25: Darstellung der Nekrosezonen bei Perforatortransplantaten mit und ohne VEGF-Applikation.

Perforatoren	VEGF	Nekroserate			
Anzahl		MW ± SD	Median (Min-Max)	P-Wert	T
4	-	14.7 ± 6.3%	15.1 (7.1-27.3)	.01*	
4	+	5.39 ± 4.0%	4.24 (1.3-12.7)		
2	-	31.39 ± 6.54%	31.4 (24.3-41.9)	.004*	
2	+	10.23 ± 6.34%	10.9 (1.1-17.9)		
1	-	72.19 ± 6.23%	70.0 (65.6-82.7)	<.004*	
1	+	17.71 ± 6.72%	20.7 (6.3- 22.9)		
Multiple Regressionsanalyse					
Perforator Anzahl				<.001**	-6.165
VEGF				<.001**	-6.541

Tabelle 7: Einfluss der Anzahl der Perforatoren und VEGF Applikation auf die Nekrosegröße. Zwischen den einzelnen Gruppen, aber auch in Abhängigkeit von der VEGF-Applikation zeigen sich signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test.

3.3.2 Perforatorengruppe - O2C Messungen

Die Messungen mittels O2C-Gerät ergaben signifikante Unterschiede für die Werte der Sauerstoffsättigung (SO₂) in der Gruppe mit 4 Perforatoren im Vergleich der Gruppe mit einem Perforator. Die Gruppen mit weniger Perforatoren im Vergleich zu denen mit 3-4 Perforatoren zeigten eine generell niedrigere Sauerstoffsättigung (SO₂), niedrigere Flow und Velocity Werte und höhere Hb-Messwerte. Diese Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 30, Tabelle 8). Als Kontrolle wurden die Werte vor der Hebung verwendet.

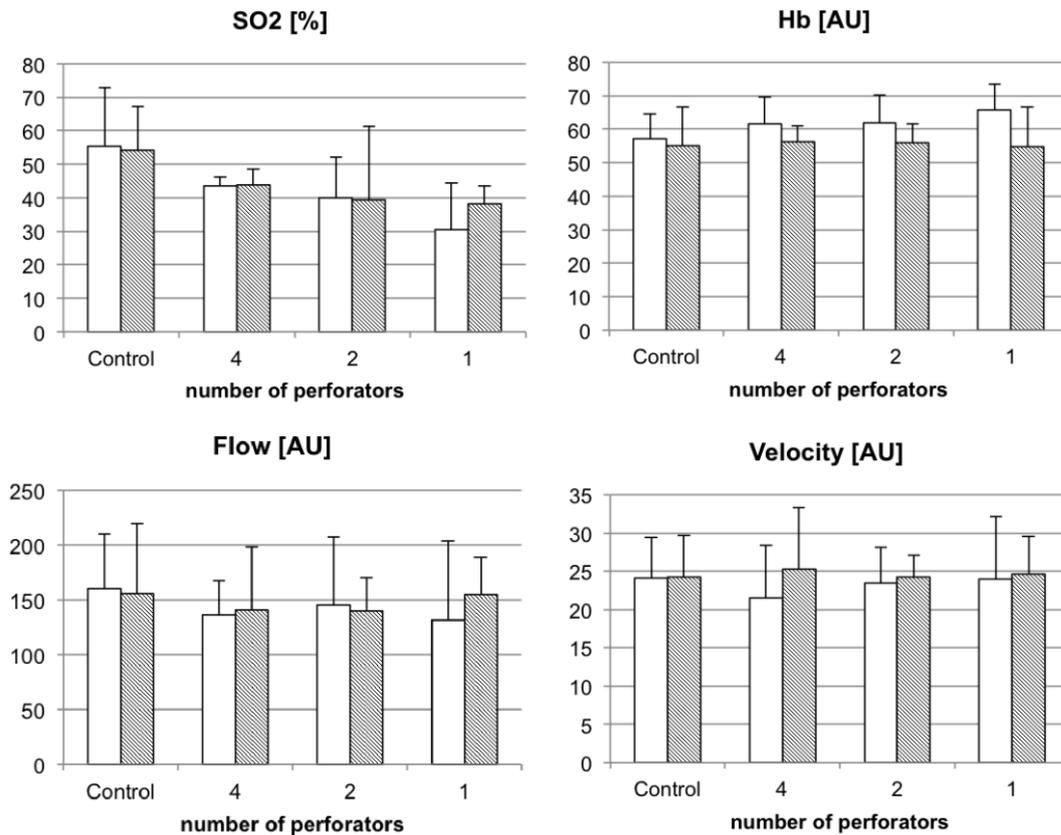


Abbildung 26: Ergebnisse der O2C Messungen der Perforatorgruppe, Bezug nehmend auf die Anzahl der Perforatoren.

Weißer Balken repräsentieren die Gruppen ohne VEGF, dunkle Balken mit VEGF. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Perforatoren und der gemessenen SO2 innerhalb des Gewebetransplantates.

Parameter		Kontrolle		Anzahl der Perforatoren					
			VEGF	4	4	2	2	1	1
			VEGF		VEGF		VEGF		VEGF
SO2 [%]	Mittelwert ± SD	55 ± 18	54 ± 13	44 ± 3	44 ± 5	40 ± 12	39 ± 22	31 ± 14	38 ± 5
	Median (Min-Max)	62 (26-80)	51 (34-88)	44 (37-48)	43 (34-51)	37 (26-66)	39 (11-76)	33 (3-49)	38 (28-48)
Hb [AU]	Mean ± SD	57 ± 7	55 ± 12	61 ± 8	56 ± 5	62 ± 8	56 ± 5	66 ± 8	55 ± 12
	Median (Min-Max)	58 (44-74)	53 (30-82)	61 (44-74)	58 (30-62)	59 (53-74)	57 (44-65)	64 (58-82)	55 (43-101)
Flow [AU]	Mean ± SD	160 ± 51	155 ± 64	136 ± 32	140 ± 58	145 ± 63	140 ± 30	132 ± 72	155 ± 34
	Median (Min-Max)	153 (75-394)	139 (62-319)	122 (75-225)	126 (62-255)	129 (71-290)	133 (48-197)	111 (30-279)	146 (96-245)
Velocity [AU]	Mean ± SD	24 ± 5	24 ± 6	22 ± 7	25 ± 8	23 ± 5	24 ± 3	24 ± 8	25 ± 5
	Median (Min-Max)	23 (17-45)	23 (14-40)	19 (17-38)	24 (14-41)	22 (18-34)	24 (19-30)	24 (11-39)	24 (16-34)

Tabelle 8: Ergebnisse der O2C Messungen: Die gemessenen Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung und Median (Range Minimum-Maximum).

3.3.3 Perforatorengruppe - Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der epigastrischen Perforatorlappen zeigten einen ähnlichen Effekt wie die gestielten epigastrischen Lappen. In der HE-Färbung zeigten sich in beiden Gruppen in den vitalen Bereichen eine regelrecht geschichtete Hautarchitektur, eine generelle akute Entzündungsreaktion sowie die Einwanderung von Neutrophilen ins intestinale Gewebe. Die inflammatorische Zellinfiltration war vor allem in der Gruppe mit einem Perforator deutlich sichtbar. Bei Transplantaten mit einer geringeren Perforatorenzahl waren in beiden Gruppen eine höhere Nekroserate mit begleitender lymphozytärer Infiltration erkennbar. Die immunhistochemische Darstellung wies eine niedrigere Expression von CD31-Antikörper und vWF-Antikörper entsprechend der geringeren Mikrogefäßdichte im Vergleich zu der mit VEGF behandelten Perforatoren Gruppe auf (Abbildung 31).

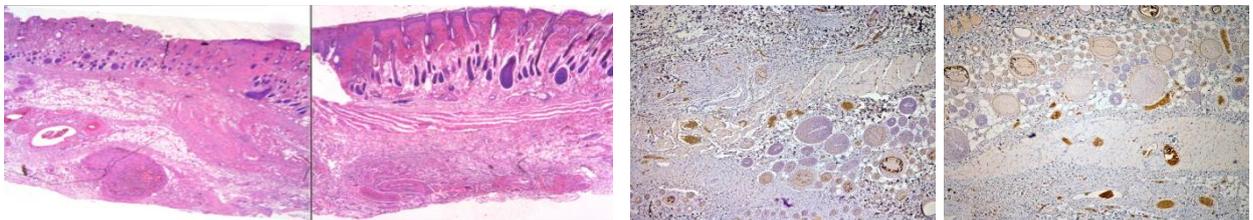


Abbildung 27: Histologische Darstellung der Gewebetransplantate mit signifikant höherer Anzahl an lymphozytärer Infiltration und Nekrosezonen bei geringerer Perforatorenzahl (links: 1 Perforator, rechts: 3 Perforatoren).

3.3.4 Einfluss von VEGF auf Perforatortransplantate

3.3.4.1 Flächenauswertung der Perforatortransplantate abhängig von der Anzahl der Perforatoren und der VEGF Applikation

Nach präoperativer Injektion von 20µl VEGF war die Größe der Nekrosezone abhängig von der Anzahl der Perforatoren $5,4 \pm 4\%$ [1,3-12,8%] bei 3-4 Perforatoren, $10,2 \pm 6,3\%$ [1,2-17,9%] bei 2 Perforatoren und $17,7 \pm 6,7\%$ [6,4-23,0%] bei Belassen von einem Perforator. Auch hier zeigte sich eine signifikante kleinere Nekrosezone, je höher die Anzahl der Perforatoren war (Abbildung 32, Tabelle 8).

Beim Vergleich der Gruppen mit präoperativer VEGF Injektion und ohne VEGF Injektion bei gleicher Perforatorenanzahl zeigte die Gruppe, denen VEGF präoperativ appliziert wurde eine signifikant geringere Nekrosezone als die Gruppe ohne VEGF Applikation. Des Weiteren ergab die multiple Regressionsanalyse für die Faktoren Perforatorenanzahl und VEGF Applikation einen prognostischen Zusammenhang für die Nekroserate ($p < 0,001$, Tabelle 8).



Abbildung 28: Perforatorgruppe mit VEGF: Bild links Belassen von 3 Perforatoren, Bild mittig Reduktion auf 2 Perforatoren und Bild rechts Reduktion auf einen Perforator zur Durchblutung des epigastrischen Lappentransplantates

3.3.4.2 Perforatorgruppe mit VEGF - O2C Messungen

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei den O2C Messungen der epigastrischen Lappentransplantate für die Sauerstoffsättigung (SO₂) in der Gruppe mit 4 Perforatoren und Injektion von 20 µl VEGF präoperativ im Vergleich zur Gruppe ohne VEGF.

Durch die präoperative Injektion von VEGF wurden am 7. postoperativen Tag höhere SO₂, Flow und Velocity Werte und niedrigere Hb Werte gemessen im Vergleich zur Gruppe ohne VEGF. Als Kontrolle wurden die Werte vor der Hebung verwendet. Diese Werte waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 30).

3.3.4.3 Perforatorgruppe mit VEGF - Histologische und Immunhistologische Untersuchungen

In der HE-Färbung zeigte sich eine verbesserte Integrität des Gewebes in der VEGF-Gruppe, in der Gruppe ohne VEGF war hingegen das Auftreten von vermehrten Zellnekrosen im klinisch vitalen Bereich auffällig.

Bei einer geringeren Perforatorenzahl zeigte sich wie schon in der Gruppe ohne VEGF eine höhere Nekroserate mit begleitender lymphozytärer Infiltration. Es fielen jedoch in dieser, im Vergleich zur VEGF Gruppe, vermehrt Epithel- und Fettnekrosen auf. Die immunhistochemische Darstellung wies eine höhere Expression von CD31 und vWF in allen Gruppen, in denen präoperativ VEGF injiziert wurde sowie eine höhere Mikrogefäßdichte auf (Abbildung 33).

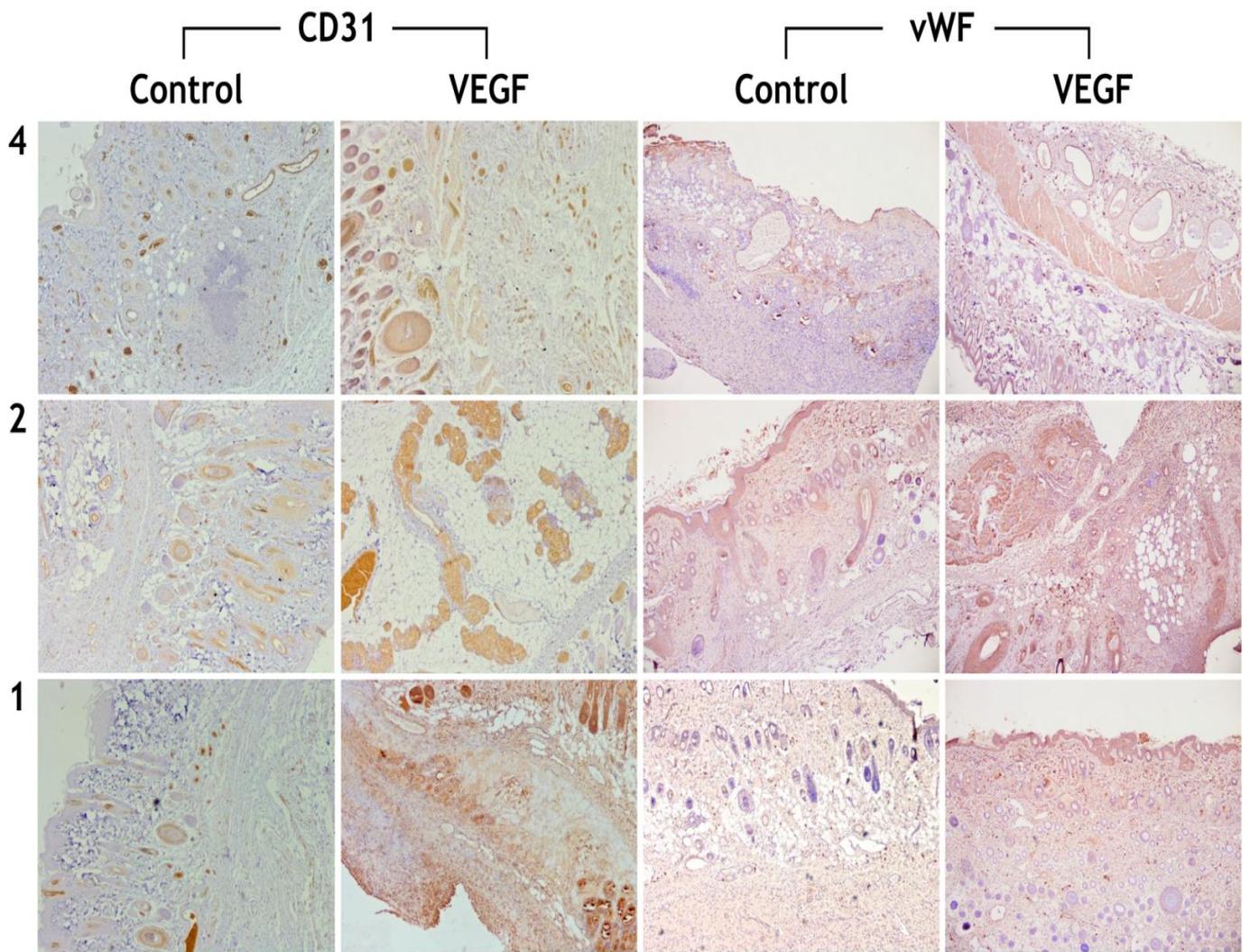


Abbildung 29: Immunhistochemische Untersuchungen der Perforatorlappen zeigen in der Gruppe der präoperativen VEGF Applikation eine deutlich stärkere Expression in der Färbung mit vWF-AK sowie CD31 AK im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne VEGF Applikation.

Als Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit bleiben festzuhalten:

- die epigastrischen Lappentransplantate der Ratte sind innerhalb kurzer Zeit durch Kapillareinsprossung aus dem Lagergewebe vom Gefäßstiel unabhängig und weisen zwischen dem 5. und 7. Tag eine Autonomisierung auf
- die Nekrosezone nimmt mit Dauer des Zeitpunktes der Ligation des Gefäßstiels deutlich ab
- die Werte der O2C Messungen korrelieren mit der Stoffwechsellage und dem klinischen Verlauf der Vitalität der Lappentransplantate sowie der Entwicklung von Nekrosezonen
- Hb, Flow und Velocity haben prognostische Bedeutung bei der Vorhersage der Entwicklung einer Nekrose bei präoperativer sowie postoperativer Messung
- SO2 und Flow sind signifikante Faktoren für die Vorhersage der autonomen Versorgung des Transplantates. Je niedriger diese Werte sind, desto größer ist die Entwicklung der Lappennekrose.
- die Einheilung von dünnen Gewebetransplantaten kann durch VEGF extrem beschleunigt werden; es kommt zu einer signifikant früheren Autonomisierung im Vergleich mit den Gewebetransplantaten ohne VEGF Applikation und zu einer Steigerung des überlebenden Gewebeareals
- die verschiedenen Applikationsmöglichkeiten von VEGF sind für die Verbesserung der Einheilungsgeschwindigkeit und des vitalen Gewebeanteils nicht relevant
- die Anzahl der Perforatoren von dünnen Gewebstransplantaten ist für die Vitalität des Hautlappens wichtig; eine zu starke Reduktion der Versorgung weist eine exponentielle Nekroseausbildung auf
- die präoperative Applikation von VEGF führt auch bei Perforatorlappen unabhängig von der Anzahl der Perforatoren zu einer signifikant geringeren Nekroserate

4. Diskussion

4.1. Autonomisationszeitpunkt

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Abhängigkeit vom Lappenstiel in dem Modell des epigastrischen Lappentransplantates limitiert ist und mit zunehmender Dauer und Einheilungszeit des Transplantats, bis zum Zeitpunkt der Stielunterbindung, die Nekrosezone deutlich abnimmt.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen über den Zeitpunkt der Einheilung eines Gewebetransplantates und der Unabhängigkeit vom zuführenden Gefäßstiel lieferten unterschiedliche Aussagen. Die bisher durchgeführten Studien erbrachten Informationen über den klinischen Verlauf, prä-, peri-, und postoperative Messungen und deren Veränderungen während freier Lappenoperationen sowie Daten über die Einheilung von Gewebetransplantaten und Faktoren, die für Lappenverlust und Autonomisation verantwortlich gemacht werden (Wolff et al. 2009, Hölzle et al. 2006, Knobloch, Gohritz and Vogt 2008, Hölzle et al. 2010, Knobloch 2009, Mücke et al. 2011a).

Die Frage wie lange ein Gewebetransplantat von seinem Gefäßstiel abhängig ist konnte bisher aber nicht klar beantwortet werden. Black et al. beschreiben in einer der ersten dazu durchgeführten Studien, dass die Zeit, die ein epigastrisches Gewebetransplantat nach Stielunterbindung benötigt um autonom zu werden, zwischen 6 und 8 Tagen dauert (Black et al. 1978). Young et al. beschreiben ähnliche Ergebnisse der Revaskularisation für freie Lappen mit einer Dauer von 7 bis 10 Tagen (Young 1982). Nach Black et al. könnten Gründe für die relativ frühe Autonomisierung, das Eingliedern des Gewebetransplantates in einen gesunden Wundgrund sein. Diese optimalen Bedingungen sind jedoch in den klinischen Situationen nicht immer gegeben. Hier können z.B. Wundinfektionen oder Strahlentherapie die Einheilung des Transplantates verändern und gefährden (Wolff et al. 2009, Moscoso et al. 1994, Mücke et al. 2010b, Cohn et al. 2008, Kruse et al. 2010). Wolff et al beschreiben eine Zeitdauer von 18 Tagen bis zur Autonomisierung eines mikrochirurgischen „wrist-carrier“-Transplantates (Wolff et al. 2009). Mücke et al. zeigen in einer klinischen

Studie, dass abhängig von der Art des Transplantates, dem Ort des zu rekonstruierenden Gebietes sowie dem Zustand des Wundbettes, eine zuverlässige Neovaskularisation erst innerhalb von vier Wochen erreicht ist. Aber auch nach 12 Wochen zeigen einige Transplantate am harten und weichen Gaumen noch eine Abhängigkeit von ihrem Gefäßstiel (Mücke et al. 2012b). Machens et al. beobachteten sogar eine Abhängigkeit vom Gefäßstiel bis zu über 10 Jahren (Machens et al. 1998). Die Zeit die ein Transplantat benötigt, um autonom zu werden, ist demnach stark vom Transplantattyp und dem Zustand des Empfängerbetts abhängig. In Tierversuchen spielen auch das Studienprotokoll und Tiermodell eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit sollten an 24 Ratten ein epigastrisches fasziokutanes Gewebetransplantat gehoben werden und auf ihre Autonomisierungsfähigkeit untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in dem epigastrischen Lappenmodell an der Ratte die Autonomisation des Transplantates zwischen Tag 3 und 5 deutlich ansteigt. Wird der Transplantatstiel nach 3 Tagen unterbunden, entwickelt sich eine 62% Nekrose bezogen auf die Lappengröße. Eine Unterbindung nach 5 Tagen hat eine schon fast vollständige Einheilung des Transplantates zur Folge. Eine Stielunterbindung an Tag 7 und 10 hat zu einer vollständigen autonomen Transplantatversorgung geführt. Ein signifikanter Unterschied war hier nicht mehr festzustellen ($p=0,257$, mit einer Nekrosegröße von $2,88 \pm 0,14\%$ an Tag 7 und $1,64 \pm 0,16\%$ an Tag 10). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Zeit der Einheilung einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Nekrosen des transplantierten epigastrischen Lappens hatte. Oswald et al. beobachteten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung von Inseln und freien Lappen: Die 2x3 cm großen, freien Lappen zeigten nach Tag 5 eine komplette Unabhängigkeit vom Lappenstiel (Oswald, Tilgner and Schumann 1988). Obwohl die Transplantate in dieser Arbeit wesentlich größer sind, sind die Ergebnisse mit denen von Oswald et al. vergleichbar.

4.2 Perforatortransplantate

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Perforatoranzahl auf das Transplantat in vivo untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Perforatoren in einem epigastrischen Perforatorlappen einen signifikanten Einfluss auf

die Überlebensrate der Transplantate zeigen. Dieser Effekt kann mit einmaliger VEGF Injektion signifikant gesteigert werden.

Ein großer Vorteil der Perforatortransplantate ist eine retrograde Präparationstechnik, durch die überflüssiges Fett und Muskelgewebe an der Entnahmestelle belassen werden kann (Hölzle, Wolff and Mohr 2008). Dadurch entstehen sehr dünne Transplantate und die Möglichkeit des Primärverschlusses sowie einer niedrigeren Entnahmemorbidität (Lin and Chen 2012). Die dünnen Transplantate zeichnen sich im intraoralen Bereich durch gute Formbarkeit, relative Haarlosigkeit, Geschmeidigkeit und vorteilhafte ästhetische Komponenten aus und gestatten eine flexible Einsatzmöglichkeit bei der Rekonstruktion von intraoralen Defekten, aber auch im extraoralen Bereich. Durch den relativen geringen Durchmesser der Perforatorgefäße und des relativ kurzen Gefäßstiels ist die Bildung von Anastomosen mit gängigen Gefäßen im Kopf- Halsbereich nicht immer ohne Probleme möglich und in Fällen, die eine radikale Neck Dissection erfordern und eine Opferung aller Äste der A. Carotis zur Folge haben, sehr schwierig. Bei einer durchschnittlichen Stiellänge von 4-6 cm ist die Mobilisation des Lappens in alle gewünschten Bereiche der Mundhöhle nicht immer möglich. Folglich können Spannungen in den Gefäßen und der Anastomose auftreten und den Erfolg des Lappentransfers gefährden (Hölzle 2006). Doch dieser zunächst als Nachteil zu wertende Umstand ermöglicht die Anastomosierung der Transplantate an kleinere Anschlussgefäße in der unmittelbaren Umgebung des zu deckenden Defektes. Dadurch kann die, bei Voroperation oder Vorbestrahlung oft mühevoll, Freilegung der tiefen Halsgefäße entfallen (Hölzle et al. 2008). Die Größe und Lage der Perforatoren im zu hebenden Transplantat kann individuell variieren (Ha and Baek 1999). Die Präparation von Perforatorlappen verlangt eine präzise präoperative Planung sowie einen erfahrenen Operateur. Eine vorsichtige Dissektionstechnik kann das operative Trauma reduzieren (Wolff et al. 2011). Dennoch kann die Dauer der Operation mehr Zeit in Anspruch nehmen als es bei anderen Transplantaten der Fall wäre (Geddes, Morris and Neligan 2003). Eine präzise präoperative Planung mittels Doppler-Sonografie, MR-Angiografie oder Kontrastmittel-CT stellen Möglichkeiten dar, um präoperativ die relevanten Perforatoren zu identifizieren und das perioperative Trauma, das bei der intraoperativen Suche nach den Perforatoren entsteht, zu minimieren (Hallock 2003b, Lorenz and Esclamado 2001, Masia et al. 2006). Auch vaskuläre Komplikationen in Folge von Gefäßspasmen oder Undurchgängigkeit sind bei Perforatorlappen häufiger beschrieben (Lyons 2006).

Die Präparation eines Transplantates mit mindestens zwei oder mehr Perforatoren vermindert das Risiko für vaskuläre Komplikationen und ermöglicht eine größere Flexibilität des Lappendesigns (Patel and Keller 2008, Rubino et al. 2006, Lyons 2006, Lin and Chen 2012, Loeffelbein, Holzle and Wolff 2006). Bestätigend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Anzahl der Perforatoren und die Initiierung der Angiogenese jeweils eine wesentliche Rolle spielen. Auch wenn einige generelle Regeln bezüglich der Transplantatgröße und Perforatordurchmesser schon bekannt sind, ist bisher wenig beschrieben über das Verhältnis zwischen zuverlässiger Lappengröße und optimaler Anzahl und Größe der Perforatoren sowie den verschiedenen Lappendesigns (Lin and Chen 2012). Die Größe eines Perforatortransplantates ist abhängig vom Durchmesser und Anzahl der Perforatoren, dem Volumen des gehobenen Lappens und der Gefäßverzweigung im Transplantat. Da keine exakten Standards existieren, wird in der Klinik oft ein Kompromiss gefunden zwischen der benötigten Lappengröße, die notwendig ist um den Defekt zu schließen und der Sicherheit das eine ausreichende Transplantatversorgung durch die Perforatoren gewährleistet ist. Die meisten Arbeiten, die sich mit dem Verhältnis zwischen Anzahl der Perforatoren, Größe des Transplantates und der Perfusion des Lappens beschäftigen, basieren auf theoretischen Modellen (Patel and Keller 2008, Rubino et al. 2006). Einige Autoren beschreiben, dass der Durchmesser des Hauptperforators das wichtigste Kriterium für die Überlebensrate des Transplantates ist. In Hinblick auf das chirurgische Trauma bei Präparation weiterer Perforatoren und der längeren Operationszeit, werden zusätzliche Perforatoren nur bei dünnen Durchmesser des Hauptperforators empfohlen (Patel and Keller 2008). Wird das Transplantat von mehr als einem Perforator durchblutet, ist die Möglichkeit gegeben, das Design des Lappens exakt an die notwendige Größe des zu rekonstruierenden Defektes anzupassen (Lyons 2006). Die Verwendung von mehreren separaten Perforatoren hat außerdem den Vorteil, dass das Risiko von vaskulären Komplikationen minimiert wird (Lyons 2006). Baumann et al. beschreiben in einer prospektiven klinischen Analyse zur Brustrekonstruktion mittels abdominalen freien Lappen eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl der Perforatoren und der Inzidenz von Fettgewebsnekrosen (Baumann, Lin and Chevray 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine höhere Inzidenz der Fettgewebsnekrose in den Transplantaten mit einem Perforator.

Im Gegensatz zu den anderen bisher beschriebenen Theorien zur Versorgung der Perforatortransplantate, konnte in dieser Arbeit eine signifikante, inverse Korrelation zwischen Anzahl der Perforatoren und Größe der Nekrosezone gezeigt werden. Dieses Ergebnis konnte durch histologische Analysen bestätigt werden. Das Verhältnis von Perforatoranzahl und Größe der Nekrosezone zeigte nicht einen linearen Verlauf, sondern einen Exponentiellen. Die Hypothese, dass die Transplantate bei kontinuierlicher Durchblutung eine Versorgung der Transplantate tolerieren, konnte damit nur bedingt bestätigt werden, da die zu starke Reduktion der Versorgung eine zunehmende, exponentielle Nekroseausbildung zur Folge hatte.

4.3 O2C

4.3.1 Die Anwendung von O2C

Das Messprinzip des O2C-Gerätes beruht auf einer Kombination von Laser-Doppler-Flowmetrie und Weißlichtspektrometrie und damit auf der simultanen Überwachung der Perfusion und Gewebeoxygenierung. Die Laserlichtverschiebung des O2C-Gerätes durch sich bewegenden Erythrozyten wird von Photodetektoren aufgenommen und vom Messgerät in Einheiten quantifiziert. Die Anwendung des O2C Gerätes zum Monitoring für Gewebetransplantate wird in der Literatur als praktikabel und zuverlässig beschrieben (Hölzle 2006, Mücke 2012) sowie anwendbar an allen weichen Geweben wie Haut, Schleimhaut, Fett und Muskel (Hölzle et al. 2012). Vorteile des O2C-Gerätes liegt in der Noninvasivität der Messmethode und Möglichkeit der kontinuierlichen Überwachung des Transplantates. Diese Vorteile bieten andere Messmethoden wie Angiographie, pH-Bestimmung und Fluoreszenz-Untersuchungen nicht. Durch die simultane Messung von Sauerstoffsättigung und Blutfluss kann eine mangelhafte Versorgung des Gewebes dem verminderten Angebot oder dem erhöhten Verbrauch zugeordnet werden, abhängig ob der Blutfluss sinkt oder konstant bleibt.

Ein bekanntes Problem bei der Interpretation der O2C Werte ist, dass beim abgesetzten Transplantat, also bei nicht vorhandenem Blutfluss sowie im total nekrotischen Gewebe das Messsignal nicht auf Null sinkt (Tenland et al. 1983, Rodrigues, Pinto and Leal 2001, Sloan and Sasaki 1985). Caspary et al. beschreiben dieses Phänomen als "biological zero", erzeugt durch die Vibrationen der Blutzellen. Durch die Brownsche Molekularbewegung entsteht eine regellose Zitterbewegung der

Erythrozyten (Caspary, Creutzig and Alexander 1988). Diese erschwert den Vergleich von Absolutwerten.

Weiterhin ist die Anfälligkeit von potentiellen Störfaktoren während der Messung zu diskutieren, die zu falschen Messwerten führen kann. Um die Fehlerquellen zu minimieren, wurde in dieser Studie streng nach Messprotokoll vorgegangen: Während der Messung wurde jegliche externe Lichteinstrahlung wie OP-Leuchten vermieden. Das Transplantat des zu untersuchenden Tieres wurde erst nach Erreichen der chirurgischen Toleranz gemessen, um eine möglichst bewegungsarme Situation zu gewährleisten. Die Messungen erfolgten stets drucklos unter Hautkontakt sowie durch den gleichen Untersucher.

4.3.2 Messwerte O₂C

SO₂, Hb, Flow und Velocity sind, analog zur Wundheilung, sich verändernde Parameter der Autonomisierung des Transplantates und der damit assoziierten Angiogenese. Deswegen sollten auf diese Parameter während des Transplantatmonitorings besondere Aufmerksamkeit gerichtet werden (Hever et al. 2010, Tamas et al. 2010, Hölzle et al. 2006). Die Veränderung der Perfusionswerte, abhängig von der Nekrosebildung, lässt auf einen starken Einfluss dieser Parameter auf die Perfusion und Vitalität der Transplantate schließen. Die Messwerte liefern wichtige Informationen über den Zeitpunkt der autonomen Versorgung eines Transplantates und dienen der Optimierung der klinischen Anwendbarkeit sowie der klinischen Planung (Wolff et al. 2009), auch wenn sich die Ergebnisse des Zeitpunktes der Autonomisierung nicht auf jedes Transplantatdesign und jede Spezies übertragen lassen (Dorsett-Martin 2004).

Die in der Arbeit gemessenen Werte von Hb, Flow und Velocity zeigen vor allem bei den präoperativen Messungen einen hohen prädiktiven Wert für die weitere Entwicklung einer Nekrose. Je niedriger die gemessenen präoperativen Werte waren, desto größer war die Entwicklung der Nekrosezone. Diese Ergebnisse sind direkt auf klinische Situationen am Menschen übertragbar (Hölzle et al. 2006, Hölzle et al. 2010). Die Werte von SO₂ und Flow waren in der vorliegenden Arbeit vor allem nach Stielunterbindung ein verlässlich signifikanter Marker bezüglich der Vorhersage einer Nekroseentwicklung und damit indirekt ein Indikator für die Autonomisierung.

Die Flowwerte werden in der Literatur häufig als Indikator für die Vorhersage eines Lappenverlustes beschrieben v.a. bei Auftreten von chirurgischen Komplikationen wie thrombotischer Verschluss der Lappengefäße (Holm et al. 2010, Holm et al. 2009, Aps et al. 1985). Die Hb-Werte und Blutfluss als Einflussfaktor der Transplantatvitalität wurden mehrfach schon im Zusammenhang beschrieben, wobei sich bisher vor allem der Hb-Wert als Vorhersage Wert über den Verlauf der Vitalität eines Lappentransplantates bewährt hat (Serafin, Shearin and Georgiade 1977, Simpson et al. 1996, Wolff et al. 1998, Clark et al. 2007). Dennoch wurde schon in früheren Untersuchungen eine erschwerte Interpretierbarkeit der Messungen durch die große Variabilität der Messwerte sowie das Fehlen von Absolutwerten kritisiert (Hickerson, Colgin and Proctor 1990, Svensson, Holmberg and Svedman 1993). So konnten zunächst keine spezifischen Absolutwerte zur Interpretation der Messwerte der Lappenperfusion herangezogen werden, sondern es mussten interindividuelle Schwankungen bei den klinischen Messungen berücksichtigt werden (Hölzle et al. 2006). Diese Problematik konnte begrenzt werden, indem die präoperativ ermittelten Messergebnisse als Referenzwerte für die folgenden Messungen fungierten (Mücke et al. 2014). Weiterhin wurden für die klinische Anwendung von Hölzle et al. Grenzwerte definiert. Gleichzeitig wird auf patientenindividuelle Messwerte hingewiesen und dazu geraten, patientenindividuell einen intraoperativen Vergleich der noch gestielten Transplantate zu den abgesetzten Transplantaten durchzuführen (Hölzle et al. 2010).

Auch die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte von Hb, Flow und Velocity zeigten bei den präoperativen Messungen leichte Abweichungen untereinander. Die relative Veränderung der Werte im Verlauf der perioperativen Messungen korrelierten jedoch signifikant mit der Stoffwechsellage der Gewebetransplantate und der Größe der Nekrosezone wie auch schon in anderen Studien beschrieben (Wolff et al. 2009, Fischer, Parker and Shaw 1983) und können somit als valide Parameter zur Prädiktion von Gewebenekrosen verwendet werden.

Die O2C Analysen in der Perforatorgruppe zeigten für die SO₂ Perfusionmessungen ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit 3-4, 2 und einem Perforator, entsprechend den klinischen und histologischen Ergebnissen. Die anderen Parameter Hb, Flow und Velocity waren ähnlich der SO₂ Werte, entsprechend der Hypothese, dass mit Anzahl der Perforatoren die Wahrscheinlichkeit für eine

Lappennekrose sinkt. Die gemessenen Werte waren jedoch nicht signifikant in den verschiedenen Gruppen.

4.4 VEGF

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von VEGF an den beschriebenen Transplantatmodellen evaluiert. Die Applikation von VEGF erhöhte die Überlebensrate der Transplantate signifikant.

Die Einheilung und die autonome Versorgung des Transplantates wird durch VEGF signifikant beschleunigt. Dieses wird v.a. am 3. und 5. postoperativen Tag nach Stielunterbindung deutlich. Am 7. und 10. Tag zeigt sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe, was die Ergebnisse bestätigt, dass die Vaskularisation zur autonomen Versorgung des epigastrischen Transplantates der Ratte zwischen dem 5. und 7. Tag abgeschlossen ist. Durch die Injektion von VEGF war eine signifikant größere Anzahl der Transplantate schon nach 3 Tagen autonom im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Durch den Einsatz von VEGF konnte bereits in mehreren Untersuchungen eine Perfusionssteigerung nachgewiesen werden. Padubidri et al. fanden nach VEGF Injektion in die A. epigastrica eine Zunahme der überlebenden Transplantatfläche des epigastrischen Lappens der Ratte. Der Erfolg wurde auf die erhöhte Kapillardichte zurückgeführt (Padubidri and Browne 1996). Ähnliche Ergebnisse beschreiben Kryger et al. in ihrer Studie, in der sie den Effekt verschiedener Applikationsformen am Beispiel des random-pattern-flaps untersuchten. Sie beschreiben eine Transplantatüberlebensrate von 78-96 % bei VEGF Injektion. Weiterhin wurden die Auswirkungen der Effektivität von VEGF bei systemischer, subdermaler, subfaszialer und topischer Injektion auf die Überlebensrate der Transplantate untersucht. Die Nekroseraten lagen hierbei alle in ähnlichen Bereichen. So resultierte eine Lappennekroserate von 22% bei topischer VEGF Injektion, 14% bei Injektion in das Gewebe, 12 % Nekroserate bei subdermaler Injektion, 12% bei systemischer Einzelinjektion bzw. 9 % nach mehrfacher systemischer Injektion (Kryger et al. 2000). In anderen durchgeführten Studien wurde die intravenöse Injektion (Zhang et al. 2001),

in das arterielle System (Zhang et al. 2001, Kryger et al. 1999, Machens et al. 2003) oder direkte Injektion in das Wundbett (Machens et al. 2003, Zhang et al. 2002) als signifikant bessere Applikationsmethode beschrieben.

4.4.1 Applikationszeitpunkt

In der vorliegenden Arbeit beeinflussen zwei verschiedene Faktoren die Autonomisierung der Transplantate. Zum einen wirkt das injizierte VEGF- die exogen induzierte VEGF-Produktion, zum anderen wirkt die Ligation der A. epigastrica sowie die Verwendung des Perforator Lappens als Transplantatmodell als hypoxischer Stimulus- die endogen induzierte VEGF Produktion. Ziel war es, neben dem optimalen Ligationszeitpunkt, die Auswirkung der unterschiedlichen Perforatorenanzahl, auch den effizientesten Zeitpunkt der VEGF Injektion zu ermitteln.

Zhang et al. beschreiben eine höhere Überlebensrate bei direkter postoperativer subkutaner VEGF Injektion (Zhang et al. 2002). In einer zweiten Studie beschreiben Zhang et al. eine signifikante Verbesserung der Lappenüberlebensrate bei Injektion von VEGF subkutan 7 Tage präoperativ (Zhang et al. 2001). Krum et al. beschreiben die effektivsten Ergebnisse bei Summation der Stimuli nach Ligation und 2-3 Tage präoperativer VEGF Injektion (Krum, Mani and Rosenstein 2002). Andere Autoren konstatieren eine signifikante Reduktion der Lappennekrose bei der Applikation eines für VEGF kodierenden Adenovirus 12 Stunden vor der Lappenhebung (Gurunluoglu et al. 2002). In der Literatur konnte jedoch bisher keine Evidenz für den Vorzug eines Zeitpunktes der VEGF Injektion bewiesen werden (Spanholtz et al. 2009, Goncalves et al. 2010).

In Anlehnung an diese Untersuchungen konnte in der Arbeit kein Vorteil eines bestimmten Applikationszeitpunktes belegt werden. Der Zeitpunkt der VEGF Injektion zeigte keinen Einfluss auf die resultierende Nekrosegröße und die Vitalität der Transplantate. Es konnte auch zwischen den verschiedenen Applikationsformen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch die mehrfache Applikation führte zu keiner Änderung der entwickelten Nekrosegröße. Dieses bestätigt, dass im ischämischen Lappenmodell der Ratte die Initiation der Angiogenese im Prozess der Lappeneinheilung und Autonomisation wichtiger ist als der exakte Zeitpunkt oder die

kontinuierliche Behandlung mit Angiogenese induzierenden Faktoren (Kryger et al. 2000, Zhang et al. 2001, Kryger et al. 1999, Zhang et al. 2002).

4.4.2 Perforatortransplantate und VEGF

Präoperative Injektion von VEGF hat auch einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Perforatortransplantate. Transplantate, die mit VEGF behandelt wurden, zeigten eine signifikante kleinere Nekrosezone im Vergleich zu den Perforatortransplantaten, die nicht mit VEGF behandelt wurden, bei jeweils gleicher Anzahl an Perforatoren. In allen VEGF Gruppen betrug die Ausprägung der Nekrose unter 20%, auch in der Gruppe in der nur ein Perforator belassen wurde. Nach dem 5.postoperativen Tag war unabhängig von der Perforatoranzahl kein Unterschied innerhalb der VEGF Gruppe mehr nachzuweisen. Im Vergleich dazu zeigte sich in der Gruppe mit einem Perforator ohne VEGF Behandlung eine Nekrosezone von über 70 %. Dieses Ergebnis spricht für die proangiogenetische Wirkung (Connolly et al. 1989, Kryger et al. 2000, Padubidri and Browne 1996) sowie den vasodilatatorischen Effekt von VEGF (Ahmed et al. 1997, Ku et al. 1993) .

Die Wirkung des akuten vasodilatatorischen Effektes von VEGF wurde in der vorliegenden Arbeit durch den mit dem O₂C gemessenen Anstieg von Flow und Velocity deutlich. In der Literatur werden durch die intraarterielle Infusion von VEGF eine Vasorelaxation (Ku et al. 1993, Sellke et al. 1996) sowie die Steigerung des Blutflusses (Lopez et al. 1997) mehrfach beschrieben. Auch die Applikation von VEGF in die menschliche A.thoracica interna resultiert in einer Vasorelaxation (Liu et al. 2002). Shen und Mitarbeiter sowie Li et al. stellten einen Zusammenhang mit dem Rezeptor VEGFR-2 dar (Li et al. 2002, Shen, Lee and Zioncheck 1999).

Da die Halbwertszeit des VEGF in der Literatur im Minutenbereich angegeben wird (Dao et al. 2018), ist nicht von einem längeren Effekt auf die Angiogenese auszugehen, sondern von einer Initiierung des proangiogenetischen Effekts (Jiang et al. 2019). Hier bietet sich beispielsweise die dauerhafte Expression über lokalen Gentransfer und die damit einhergehende Vermeidung von Lappennekrosen an (Machens et al. 2003).

Trotz der hohen, präklinischen Erfolge von VEGF zur Verbesserung der Überlebensraten von Transplantaten ist die Verwendung in der Klinik als kritisch zu betrachten, denn der Übertritt ins Blut und die daraus folgenden systemischen Wirkungen sind noch nicht ausreichend geklärt. Eine Neovaskularisation von okkulten Tumoren ist nicht ausgeschlossen (Carmeliet 2005). So spielt Angiogenese bei der Entwicklung von Tumoren eine zunehmende wichtige Rolle, gerade auch im Bereich der antiangiogenetischen Tumorthherapie (Wang et al. 2020, Surov et al. 2018).

Die erzielten Ergebnisse ermöglichen eine Übertragung auf die klinische Situation am Patienten und ermöglichen mittelfristige Anwendungsmöglichkeit zur Verbesserung der gegebenen Versorgungsmöglichkeit, dennoch kann der Zeitpunkt bis zur Autonomisation nicht ohne Einschränkung auf andere Spezies übertragen werden.

5. Ausblick

Die anhand des Tiermodells gewonnenen Informationen zur Perfusion des Lappentransplantates, der Autonomisierung, Konditionierung, Angiogeneseinitiierung und Ischämietoleranz konnte bereits verwendet werden, um ein extrakorporales Perfusionssystem zu entwickeln. Diese miniaturisierte Herz-Lungen-Maschine mit einem Pumpsystem und einem Oxygenator soll unabhängig von einer mikrochirurgischen Anastomose die Durchblutung des Lappentransplantats gewährleisten. Dieses System wurde am epigastrischen Lappentransplantat der Ratte erfolgreich getestet (Fichter et al. 2016). Das gewonnene Wissen über die Perfusion konnte nun sogar erfolgreich in die klinische Anwendung umgesetzt werden und dort neue Therapiemöglichkeiten ermöglichen, in Situationen, in denen eine Rekonstruktion mit herkömmlichen Techniken nicht mehr zu erreichen war (Wolff et al. 2020, Wolff et al. 2016).

6. Zusammenfassung

Der mikrovaskuläre, autologe Gewebetransfer stellt eine wichtige Rekonstruktionsmöglichkeit nach ablativer Tumortherapie dar. Bei notwendigen Re-Eingriffen mit Gefäßstieldurchtrennung oder der Verwendung von „wrist carrier flaps“, sowie zur Entwicklung eines externen Oxygenations- und Perfusionssystems ist das Wissen der Autonomisation von Gewebetransplantaten obligat.

Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothesen zu bestätigen, dass Hautlappen durch Kapillareinsprossung aus dem Lagergewebe innerhalb kurzer Zeit vom Gefäßstiel unabhängig sein können, diese auch bei deutlich reduziertem Sauerstoff- und Nährstoffangebot einheilen und ihre Autonomisierung durch Applikation von VEGF stark beeinflusst wird. Weiterhin sollte durch kontinuierliches Monitoren durch Laser-Spektroskopie (O2C) eine Vorhersage zur Nekroseentwicklung getroffen werden.

Am Modell des epigastrischen Lappens der Ratte wurden dafür folgende Versuchsreihen durchgeführt: I. Konventionelle Lappenhebung und Stieldurchtrennung nach 3, 5, 7 und 10 Tagen, zusätzliche VEGF Applikation subdermal ins Transplantatlager jeweils II. prä-, III. post sowie IV. prä- und postoperativ, V. modifizierte Lappenhebung durch Präparation von Perforatorlappen mit Reduktion der Blutversorgung durch Unterbindung des Lappenstiels, jedoch erhält myokutaner Perforatorgefäße, VI. zusätzlich Applikation von VEGF präoperativ. Ein kontinuierliches Monitoring der Transplantate erfolgte dabei durch Laser-Spektroskopie (O2C).

Am epigastrischen Lappentransplantat der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Abhängigkeit vom Lappenstiel in dem verwendeten Modell limitiert ist und die Nekrosezone des Transplantates mit zunehmender Zeitdauer deutlich abnimmt. Auch der Einfluss von VEGF konnte anhand der Applikation zu unterschiedlichen Zeitpunkten zuverlässig evaluiert werden. Die Zeitdauer der Einheilung von freien epigastrischen Lappentransplantaten der Ratte erfolgte zwischen dem 5. und 7. postoperativen Tag. Dieses zeigte sich anhand der Größe der Nekroserate sowie der Physiologie der Transplantate durch signifikante Messungen mittels Laser-Doppler-Spektroskopie (O2C-Gerät). Die Entwicklung einer Lappennekrose war von unterschiedlichen Messparametern zu verschiedenen Zeitpunkten der Lappenhebung und Einheilung abhängig. Präoperativ waren Hb, Flow und Velocity ($p < 0.0001$)

entscheidend, in der Einheilungsphase waren die Werte von Flow und SO₂ ($p < 0,001$) für den Verlauf der Vitalität des Lappens von Bedeutung. Diese Werte konnten in den durchgeführten Experimenten statistisch als Richtwerte für prognostische Voraussagen verifiziert werden.

Perforatorbasierte Gewebetransplantate zeigten nach Hebung eine unterschiedlich große Nekrosefläche und eine Abhängigkeit von der Anzahl der durchbluteten Perforatoren ($P < 0,001$). Eine Erhöhung der Anzahl der Perforatoren kann damit die Vitalität eines Perforatortransplantates wesentlich beeinflussen und die Überlebensrate exponentiell erhöhen. Topische, präoperative Applikation von VEGF führte zu einer Steigerung des überlebenden Gewebeareals und erhöhte die Überlebensrate der Lappentransplantate signifikant.

7. Literatur

- Adams, R. H. & K. Alitalo (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 464-78.
- Ahmed, A., C. Dunk, D. Kniss & M. Wilkes (1997) Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest*, 76, 779-91.
- Aps, C., R. G. Cox, B. J. Mayou & P. Sengupta (1985) The role of anaesthetic management in enhancing peripheral blood flow in patients undergoing free flap transfer. *Ann R Coll Surg Engl*, 67, 177-9.
- Baumann, D. P., H. Y. Lin & P. M. Chevray (2010) Perforator number predicts fat necrosis in a prospective analysis of breast reconstruction with free TRAM, DIEP, and SIEA flaps. *Plast Reconstr Surg*, 125, 1335-41.
- Beazley-Long, N., J. Hua, T. Jehle, R. P. Hulse, R. Dersch, C. Lehrling, H. Bevan, Y. Qiu, W. A. Lagreze, D. Wynick, A. J. Churchill, P. Kehoe, S. J. Harper, D. O. Bates & L. F. Donaldson (2013) VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol*, 183, 918-29.
- Black, M. J., L. Chait, B. M. O'Brien, P. J. Sykes & L. A. Sharzer (1978) How soon may the axial vessels of a surviving free flap be safely ligated: a study in pigs. *Br J Plast Surg*, 31, 295-9.
- Blondeel, N., W. D. Boeckx, G. G. Vanderstraeten, R. Lysens, K. Van Landuyt, P. Tonnard, S. J. Monstrey & G. Matton (1997) The fate of the oblique abdominal muscles after free TRAM flap surgery. *Br J Plast Surg*, 50, 315-21.
- Brenman, S. A., W. B. Barber, W. C. Pederson & W. J. Barwick (1990) Pedicled free flaps: indications in complex reconstruction. *Ann Plast Surg*, 24, 420-6.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-95.
- (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
- Caspary, L., A. Creutzig & K. Alexander (1988) Biological zero in laser Doppler fluxmetry. *Int J Microcirc Clin Exp*, 7, 367-71.
- Chao, A. H., J. Meyerson, S. P. Povoski & E. Kocak (2013) A review of devices used in the monitoring of microvascular free tissue transfers. *Expert Rev Med Devices*, 10, 649-60.
- Chen, Z. W. & W. Yan (1983) The study and clinical application of the osteocutaneous flap of fibula. *Microsurgery*, 4, 11-6.
- Chubb, D., W. M. Rozen & M. W. Ashton (2010) Early survival of a compromised fasciocutaneous flap without pedicle revision: monitoring with photoplethysmography. *Microsurgery*, 30, 462-5.
- Clark, J. R., S. A. McCluskey, F. Hall, J. Lipa, P. Neligan, D. Brown, J. Irish, P. Gullane & R. Gilbert (2007) Predictors of morbidity following free flap reconstruction for cancer of the head and neck. *Head Neck*, 29, 1090-101.
- Cohn, A. B., P. O. Lang, J. P. Agarwal, S. L. Peng, K. Alizadeh, K. M. Stenson, D. J. Haraf, E. E. Cohen, E. E. Vokes & L. J. Gottlieb (2008) Free-flap reconstruction in the doubly irradiated patient population. *Plast Reconstr Surg*, 122, 125-32.
- Connolly, D. T., D. M. Heuvelman, R. Nelson, J. V. Olander, B. L. Eppley, J. J. Delfino, N. R. Siegel, R. M. Leimgruber & J. Feder (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84, 1470-8.
- Crile, G. (1987) Landmark article Dec 1, 1906: Excision of cancer of the head and neck. With special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operations. By George Crile. *Jama*, 258, 3286-93.
- Dao, D. T., L. Anez-Bustillos, A. Pan, A. A. O'Loughlin, P. D. Mitchell, G. L. Fell, M. A. Baker, B. S. Cho, P. Nandivada, A. P. Nedder, C. J. Smithers, N. Chen, R. Comeau, K. Holmes, S. Kalled, A. Norton, B. Zhang & M. Puder (2018) Vascular Endothelial Growth Factor Enhances Compensatory Lung Growth in Piglets. *Surgery*, 164, 1279-1286.

- Dor, Y., R. Porat & E. Keshet (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1367-74.
- Dorsett-Martin, W. A. (2004) Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen*, 12, 591-9.
- Dvorak, H. F., M. Detmar, K. P. Claffey, J. A. Nagy, L. van de Water & D. R. Senger (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 107, 233-5.
- Eckert, P. & K. Schnackerz (1991) Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg*, 26, 77-84.
- Ehrenfeld, M. & G. Mast. 2000. *Gestielte muskulokutane und fasciokutane Lappen*.
- Ehrenfeld, M. & D. Riediger (1990) [Correction of subcutaneous soft tissue defects by microsurgical transplants]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 35, 100-4.
- Eriksson, E. & P. Heden (1988) Method for skin blood flow studies in the pig. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 22, 229-32.
- Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak & A. M. Dvorak (2004) Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem*, 52, 87-101.
- Ferrara, N. & T. Davis-Smyth (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.
- Ferrara, N., H. P. Gerber & J. LeCouter (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.
- Fichter, A. M., L. M. Ritschl, A. Borgmann, M. Humbs, P. B. Lupp, K. D. Wolff & T. Mücke (2016) Development of an Extracorporeal Perfusion Device for Small Animal Free Flaps. *PLoS One*, 11, e0147755.
- Fischer, J. C., P. M. Parker & W. W. Shaw (1983) Comparison of two laser Doppler flowmeters for the monitoring of dermal blood flow. *Microsurgery*, 4, 164-70.
- Frangoulis, M., P. Georgiou, C. Chrisostomidis, D. Perrea, I. Dontas, N. Kavantzias, A. Kostakis & O. Papadopoulos (2007) Rat epigastric flap survival and VEGF expression after local copper application. *Plast Reconstr Surg*, 119, 837-43.
- Frick, A., R. G. Baumeister & H. Furst (2002) [Vascularisation of a free jejunal graft at the neck in an insufficient vascular situation]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 34, 65-8.
- Futran, N. D., B. C. Stack, Jr., C. Hollenbeak & J. E. Scharf (2000) Green light photoplethysmography monitoring of free flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 126, 659-62.
- Geddes, C. R., S. F. Morris & P. C. Neligan (2003) Perforator flaps: evolution, classification, and applications. *Ann Plast Surg*, 50, 90-9.
- Germain, M. A., P. Marandas, J. Dubouset, E. Mascard & J. Legagneux (2004) [25 years review of vascular microsurgery evaluation--perspectives]. *Bull Acad Natl Med*, 188, 441-55; discussion 455-8.
- Goncalves, G. A., P. F. Vassallo, L. dos Santos, I. T. Schettert, J. S. Nakamuta, C. Becker, P. J. Tucci & J. E. Krieger (2010) Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. *Gene Ther*, 17, 305-14.
- Gurunluoglu, R., K. Ozer, B. Skugor, P. Lubiowski, K. Carnevale & M. Siemionow (2002) Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg*, 49, 161-9.
- Ha, B. & C. H. Baek (1999) Head and neck reconstruction using lateral thigh free flap: flap design. *Microsurgery*, 19, 157-65.
- Hallock, G. G. (2003a) Direct and indirect perforator flaps: the history and the controversy. *Plast Reconstr Surg*, 111, 855-65; quiz 866.
- (2003b) Doppler sonography and color duplex imaging for planning a perforator flap. *Clin Plast Surg*, 30, 347-57, v-vi.
- Hannah, M. J., R. Williams, J. Kaur, L. J. Hewlett & D. F. Cutler (2002) Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol*, 13, 313-24.

- Hasan, J., R. Byers & G. C. Jayson (2002) Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer*, 86, 1566-77.
- Hausamen, J. E., J. Reuther, E. Machtens, A. Kübler & H. Schlipphake. 2012. Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie Operationslehre und -atlas. Springer-Verlag.
- Hayden, R. E. & T. H. Nagel (2013) The evolving role of free flaps and pedicled flaps in head and neck reconstruction. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 21, 305-10.
- Healy, A. M., L. Morgenthau, X. Zhu, H. W. Farber & W. V. Cardoso (2000) VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung. *Dev Dyn*, 219, 341-52.
- Heller, L., L. S. Levin & B. Klitzman (2001) Laser Doppler flowmeter monitoring of free-tissue transfers: blood flow in normal and complicated cases. *Plast Reconstr Surg*, 107, 1739-45.
- Hever, T., N. Nemeth, E. Brath, L. Toth, F. Kiss, E. Sajtos, L. Matyas, J. Szaszko, L. Drimba, B. Peitl, Z. Csiki, I. Miko & I. Furka (2010) Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunts in the rat model. *Microsurgery*, 30, 649-56.
- Hickerson, W. L., S. L. Colgin & K. G. Proctor (1990) Regional variations of laser Doppler blood flow in ischemic skin flaps. *Plast Reconstr Surg*, 86, 319-26; discussion 327-8.
- Hirigoyen, M. B., M. L. Urken & H. Weinberg (1995) Free flap monitoring: a review of current practice. *Microsurgery*, 16, 723-6; discussion 727.
- Holm, C., U. Dornseifer, G. Sturtz, G. Basso, T. Schuster & M. Ninkovic (2010) The intrinsic transit time of free microvascular flaps: clinical and prognostic implications. *Microsurgery*, 30, 91-6.
- Holm, C., M. Mayr, E. Hofter, U. Dornseifer & M. Ninkovic (2009) Assessment of the patency of microvascular anastomoses using microscope-integrated near-infrared angiography: a preliminary study. *Microsurgery*, 29, 509-14.
- Hölzle, F. 2006. Monitoring und Optimierung der Perfusion mikrochirurgischer Transplantate und Entwicklung der retrograden Perfusion für Perforanslappen im Mund-,Kiefer-und Gesichtsbereich. In *Habilitationsschrift*.
- Hölzle, F., D. J. Loeffelbein, D. Nolte & K. D. Wolff (2006) Free flap monitoring using simultaneous non-invasive laser Doppler flowmetry and tissue spectrophotometry. *J Craniomaxillofac Surg*, 34, 25-33.
- Hölzle, F., D. A. Mitchell, A. Rau, J. Palisaar, D. J. Loeffelbein, J. Noldus, A. Hoheisel, T. Mucke, M. Kesting & K. D. Wolff (2012) Assessment of the perfusion and morbidity of the buccal mucosal donor site for grafting of urethral strictures. *J Craniomaxillofac Surg*, 40, 47-50.
- Hölzle, F., A. Rau, D. J. Loeffelbein, T. Mucke, M. R. Kesting & K. D. Wolff (2010) Results of monitoring fasciocutaneous, myocutaneous, osteocutaneous and perforator flaps: 4-year experience with 166 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39, 21-8.
- Hölzle, F., K. D. Wolff & C. Mohr (2008) Reconstructive oral and maxillofacial surgery. *Dtsch Arztebl Int*, 105, 815-22.
- Houck, K. A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li & D. W. Leung (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5, 1806-14.
- Isner, J. M. & A. Takayuki (1998) Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci*, 3, e49-69.
- Jiang, Z., X. Li, M. Chen, L. Lu & X. Gong (2019) Effect of Endogenous Vascular Endothelial Growth Factor on Flap Surgical Delay in a Rat Flap Model. *Plast Reconstr Surg*, 143, 126-135.
- Kalra, V. K., Y. Shen, C. Sultana & V. Rattan (1996) Hypoxia induces PECAM-1 phosphorylation and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol*, 271, H2025-34.
- Kamolz, L. P., P. Giovanoli, W. Haslik, R. Koller & M. Frey (2002) Continuous free-flap monitoring with tissue-oxygen measurements: three-year experience. *J Reconstr Microsurg*, 18, 487-91; discussion 492-3.
- Kaufman, T., M. S. Granick, D. J. Hurwitz & M. Klain (1987) Is experimental muscle flap temperature a reliable indicator of its viability? *Ann Plast Surg*, 19, 34-41.
- Kerrigan, C. L. & R. K. Daniel (1983) Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg*, 71, 519-24.

- Knobloch, K. (2009) Noninvasive microcirculatory flap monitoring or implantable doppler probes: only an adjunct to clinical assessment for reconstructive microsurgery? *J Reconstr Microsurg*, 25, 271-2.
- Knobloch, K., A. Gohritz & P. M. Vogt (2008) Noninvasive monitoring of microcirculatory perfusion and oxygenation in subcutaneous microsurgical flaps. *J Reconstr Microsurg*, 24, 69.
- Koshima, I. & S. Soeda (1989) Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle. *Br J Plast Surg*, 42, 645-8.
- Krug, A. 2007a. O2C (oxygen to see), Eine kurze Übersicht der Methodik. Giessen, Germany.
- (2007b) Mikrozirkulation und Sauerstoffverdürgung des Gewebes. *Phlebologie*, 6, 300-12.
- Krum, J. M., N. Mani & J. M. Rosenstein (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience*, 110, 589-604.
- Kruse, A. L., H. T. Luebbers, K. W. Gratz & J. A. Obwegeser (2010) Factors influencing survival of free-flap in reconstruction for cancer of the head and neck: a literature review. *Microsurgery*, 30, 242-8.
- Kryger, Z., T. Dogan, F. Zhang, E. Komorowska-Timek, D. Y. Shi, C. Cheng, W. C. Lineaweaver & H. J. Buncke (1999) Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. *Ann Plast Surg*, 43, 172-8.
- Kryger, Z., F. Zhang, T. Dogan, C. Cheng, W. C. Lineaweaver & H. J. Buncke (2000) The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg*, 53, 234-9.
- Ku, D. D., J. K. Zaleski, S. Liu & T. A. Brock (1993) Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 265, H586-92.
- Langer, S. G., S. J. Carter, D. R. Haynor, K. R. Maravella, D. Mattes, E. D. Strandness, Jr. & B. K. Stewart (2001) Image acquisition: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *World J Surg*, 25, 1428-37.
- Li, B., A. K. Ogasawara, R. Yang, W. Wei, G. W. He, T. F. Zioncheck, S. Bunting, A. M. de Vos & H. Jin (2002) KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension*, 39, 1095-100.
- Lin, C. T. & L. W. Chen (2012) Inclusion of extra perforators--a single and efficient measure to prevent vascular insufficiency in unreliable thoracodorsal artery perforator flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 65, 342-50.
- Liu, M. H., H. Jin, H. S. Floten, Z. Ren, A. P. Yim & G. W. He (2002) Vascular endothelial growth factor-mediated, endothelium-dependent relaxation in human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg*, 73, 819-24.
- Loeffelbein, D. J., F. Holzle & K. D. Wolff (2006) Double-skin paddle perforator flap from the lateral lower leg for reconstruction of through-and-through cheek defect - a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35, 1016-20.
- Löffler, G. 2008. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer.
- Lohman, R. F., C. J. Langevin, M. Bozkurt, N. Kundu & R. Djohan (2013) A prospective analysis of free flap monitoring techniques: physical examination, external Doppler, implantable Doppler, and tissue oximetry. *J Reconstr Microsurg*, 29, 51-6.
- Lopez, J. J., R. J. Laham, J. P. Carrozza, M. Tofukuji, F. W. Sellke, S. Bunting & M. Simons (1997) Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol*, 273, H1317-23.
- Lorenz, R. R. & R. Esclamado (2001) Preoperative magnetic resonance angiography in fibular-free flap reconstruction of head and neck defects. *Head Neck*, 23, 844-50.
- Lubbers, D. W., T. Koster & G. A. Holst (1996) O2 flux optode: a new sensing principle to determine the oxygen flux and other gas diffusions. *Adv Exp Med Biol*, 388, 59-68.
- Lyons, A. J. (2006) Perforator flaps in head and neck surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35, 199-207.
- Machens, H. G., N. Pallua, J. Pasel, P. Mailaender, J. Liebau & A. Berger (1998) Persistence of pedicle blood flow up to 10 years after free musculocutaneous tissue transfer. *Plast Reconstr Surg*, 101, 719-26.

- Machens, H. G., J. Salehi, H. Weich, S. Munch, F. Siemers, B. D. Krapohl, K. H. Herter, S. Kruger, B. Reichert, A. Berger, P. Vogt & P. Mailander (2003) Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res*, 111, 136-42.
- Mannucci, P. M. (1998) von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1359-62.
- Martin, J. D., A. R. Buckley, D. Graeb, B. Walman, A. Salvian & J. H. Hay (2005) Carotid artery stenosis in asymptomatic patients who have received unilateral head-and-neck irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63, 1197-205.
- Masia, J., J. A. Clavero, J. R. Larranaga, X. Alomar, G. Pons & P. Serret (2006) Multidetector-row computed tomography in the planning of abdominal perforator flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 59, 594-9.
- May, J. W., Jr., L. A. Chait, B. M. O'Brien & J. V. Hurley (1978) The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg*, 61, 256-67.
- Mehrara, B. J., T. Santoro, A. Smith, E. A. Arcilla, J. P. Watson, W. W. Shaw & A. L. Da Lio (2003) Alternative venous outflow vessels in microvascular breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 112, 448-55.
- Michlits, W., R. Mittermayr, R. Schafer, H. Redl & S. Aharinejad (2007) Fibrin-embedded administration of VEGF plasmid enhances skin flap survival. *Wound Repair Regen*, 15, 360-7.
- Milton, S. H. (1970) Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio. *Br J Surg*, 57, 502-8.
- Moscoco, J. F., M. L. Urken, J. Dalton, M. F. Wesson & H. F. Biller (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, 965-72.
- Mücke, T., A. Borgmann, S. Wagenpfeil, R. Gunzinger, C. Nobauer, R. Lange, J. Slotta-Huspenina, F. Holzle & K. D. Wolff (2011a) Autonomization of epigastric flaps in rats. *Microsurgery*, 31, 472-8.
- Mücke, T., A. Hapfelmeier, L. H. Schmidt, A. M. Fichter, A. Kanatas, K. D. Wolff & L. M. Ritschl (2020) A comparative analysis using flowmeter, laser-Doppler |spectrophotometry, and indocyanine green-videoangiography for detection of vascular stenosis in free flaps. *Sci Rep*, 10, 939.
- Mücke, T., A. A. Muller, K. Kansy, W. Hallermann, H. Kerkmann, N. Schuck, H. F. Zeilhofer, J. Hoffmann & F. Holzle (2011b) Microsurgical reconstruction of the head and neck--current practice of maxillofacial units in Germany, Austria, and Switzerland. *J Craniomaxillofac Surg*, 39, 449-52.
- Mücke, T., A. Rau, A. Merezias, D. J. Loeffelbein, S. Wagenpfeil, D. A. Mitchell, K. D. Wolff & T. Steiner (2014) Identification of perioperative risk factor by laser-doppler spectroscopy after free flap perfusion in the head and neck: a prospective clinical study. *Microsurgery*, 34, 345-51.
- Mücke, T., A. Rau, J. Weitz, A. Ljubic, N. Rohleder, K. D. Wolff, D. A. Mitchell & M. R. Kesting (2012a) Influence of irradiation and oncologic surgery on head and neck microsurgical reconstructions. *Oral Oncol*, 48, 367-71.
- Mücke, T., C. Reeps, K. D. Wolff, D. A. Mitchell, A. M. Fichter & M. Scholz (2013) Objective qualitative and quantitative assessment of blood flow with near-infrared angiography in microvascular anastomoses in the rat model. *Microsurgery*, 33, 287-96.
- Mücke, T., K. D. Wolff, A. Rau, V. Kehl, D. A. Mitchell & T. Steiner (2012b) Autonomization of free flaps in the oral cavity: A prospective clinical study. *Microsurgery*, 32, 201-6.
- Mücke, T., K. D. Wolff, S. Wagenpfeil, F. Holzle & M. Scholz (2010a) Reliability of near-infrared angiography and micro-Doppler sonography for evaluating microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg*, 126, 1506-14.
- Mücke, T., K. D. Wolff, S. Wagenpfeil, D. A. Mitchell & F. Holzle (2010b) Immediate microsurgical reconstruction after tumor ablation predicts survival among patients with head and neck carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 17, 287-95.
- Muller, W. A., C. M. Ratti, S. L. McDonnell & Z. A. Cohn (1989) A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, 170, 399-414.

- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch & Z. Poltorak (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, 13, 9-22.
- Neuhauser, T. S., G. A. Derringer, L. D. Thompson, J. C. Fanburg-Smith, M. Miettinen, A. Saaristo & S. L. Abbondanzo (2000) Splenic angiosarcoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 28 cases. *Mod Pathol*, 13, 978-87.
- Oesterwitz, H., M. Ghods & M. Geomelas. 2014. *Praktische Mikrochirurgie, Anwendungen in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie und der Urologie*.
- Oswald, P., A. Tilgner & D. Schumann (1988) The influence of postoperative vessel occlusion on the viability of free microvascular skin-fat flaps and island flaps in rats. *J Reconstr Microsurg*, 4, 403-7.
- Padubidri, A. & E. Browne, Jr. (1996) Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg*, 37, 604-11.
- Patel, S. A. & A. Keller (2008) A theoretical model describing arterial flow in the DIEP flap related to number and size of perforator vessels. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61, 1316-20; discussion 1320.
- Picard-Ami, L. A., Jr., J. G. Thomson & C. L. Kerrigan (1990) Critical ischemia times and survival patterns of experimental pig flaps. *Plast Reconstr Surg*, 86, 739-43; discussion 744-5.
- Reuther, J. (1992) Surgical Therapy of oral carcinomas. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 20, 24.
- Robinson, C. J. & S. E. Stringer (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114, 853-65.
- Rodrigues, L. M., P. C. Pinto & A. Leal (2001) Transcutaneous flow related variables measured in vivo: the effects of gender. *BMC Dermatol*, 1, 4.
- Romer, L. H., N. V. McLean, H. C. Yan, M. Daise, J. Sun & H. M. DeLisser (1995) IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol*, 154, 6582-92.
- Rubino, C., V. Coscia, A. M. Cavazzuti & V. Canu (2006) Haemodynamic enhancement in perforator flaps: the inversion phenomenon and its clinical significance. A study of the relation of blood velocity and flow between pedicle and perforator vessels in perforator flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 59, 636-43.
- Schmelzeisen, R., Y. Michiwaki, R. Reich, M. Prokop, T. Wegener, T. Bettin & T. Hacki. 1991. Überlebensrate und funktionelle Ergebnisse nach mikrochirurgischen Rekonstruktionsverfahren im Bereich der Mundhöhle. In *Fortschritte der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, ed. K. Schuchardt, 82. Stuttgart.
- Schon, R., R. Gutwald, A. Schramm, J. Duker, N. C. Gellrich & R. Schmelzeisen (2002) [Color duplex ultrasound in monitoring vascularized fibula transplants]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 6, 319-22.
- Schultze-Mosgau, S., J. Wiltfang, F. Birklein & F. W. Neukam (2003) Micro-lightguide spectrophotometry as an intraoral monitoring method in free vascular soft tissue flaps. *J Oral Maxillofac Surg*, 61, 292-7; discussion 297.
- Sellke, F. W., S. Y. Wang, A. Stamler, J. J. Lopez, J. Li, J. Li & M. Simons (1996) Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am J Physiol*, 271, H713-20.
- Senger, D. R., L. Van de Water, L. F. Brown, J. A. Nagy, K. T. Yeo, T. K. Yeo, B. Berse, R. W. Jackman, A. M. Dvorak & H. F. Dvorak (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 12, 303-24.
- Serafin, D., J. C. Shearin & N. G. Georgiade (1977) The vascularization of free flaps: a clinical and experimental correlation. *Plast Reconstr Surg*, 60, 233-41.
- Shaari, C. M., D. Buchbinder, P. D. Costantino, W. Lawson, H. F. Biller & M. L. Urken (1998) Complications of microvascular head and neck surgery in the elderly. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124, 407-11.
- Shen, B. Q., D. Y. Lee & T. F. Zioncheck (1999) Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem*, 274, 33057-63.

- Silverberg, B., J. C. Banis, Jr. & R. D. Acland (1985) Mandibular reconstruction with microvascular bone transfer. Series of 10 patients. *Am J Surg*, 150, 440-6.
- Simpson, K. H., P. G. Murphy, P. M. Hopkins & A. G. Batchelor (1996) Prediction of outcomes in 150 patients having microvascular free tissue transfers to the head and neck. *Br J Plast Surg*, 49, 267-73.
- Sloan, G. M. & G. H. Sasaki (1985) Noninvasive monitoring of tissue viability. *Clin Plast Surg*, 12, 185-95.
- Solomon, G. A., M. J. Yaremchuk & P. N. Manson (1986) Doppler ultrasound surface monitoring of both arterial and venous flow in clinical free tissue transfers. *J Reconstr Microsurg*, 3, 39-41.
- Song, D. H., R. R. Reid, L. C. Wu, G. Wirth & A. H. Dorafshar. 2007. Essentials for Students Workgroup. In *The American Society of Plastic Surgeons*.
- Soutar, D. S., L. R. Scheker, N. S. Tanner & I. A. McGregor (1983) The radial forearm flap: a versatile method for intra-oral reconstruction. *Br J Plast Surg*, 36, 1-8.
- Spanholtz, T., A. Maichle, C. Niedworok, B. M. Stoeckelhuber, S. Kruger, T. Wedel, T. Aach, G. Middeler, T. Hellwig-Burgel, A. Bader, S. Kregel, O. J. Muller, W. M. Franz, W. Lindenmaier & H. G. Machens (2009) Timing and targeting of cell-based VEGF165 gene expression in ischemic tissue. *J Surg Res*, 151, 153-62.
- Strauch, B. & D. E. Murray (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, 325-9.
- Strauss, J. M., F. W. Neukam, S. Krohn, R. Schmelzeisen & F. Borchard (1994) [Postoperative monitoring of microvascular flap repair with pulse oximetry--initial experience]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 26, 80-3.
- Surov, A., L. Leifels, H. J. Meyer, K. Winter, O. Sabri & S. Purz (2018) Associations Between Histogram Analysis DCE MRI Parameters and Complex (18)F-FDG-PET Values in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*, 38, 1637-1642.
- Svensson, H., J. Holmberg & P. Svedman (1993) Interpreting laser Doppler recordings from free flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 27, 81-7.
- Takahashi, H. & M. Shibuya (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 109, 227-41.
- Tamas, R., N. Nemeth, E. Brath, M. Sasvari, C. Nyakas, B. Debreczeni, I. Miko & I. Furka (2010) Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model. *Microsurgery*, 30, 282-8.
- Taylor, G. I. & N. Watson (1978) One-stage repair of compound leg defects with free, revascularized flaps of groin skin and iliac bone. *Plast Reconstr Surg*, 61, 494-506.
- Tenland, T., E. G. Salerud, G. E. Nilsson & P. A. Oberg (1983) Spatial and temporal variations in human skin blood flow. *Int J Microcirc Clin Exp*, 2, 81-90.
- Uccelli, A., T. Wolff, P. Valente, N. Di Maggio, M. Pellegrino, L. Gurke, A. Banfi & R. Gianni-Barrera (2019) Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Med Wkly*, 149, w20011.
- Vermeulen, P. B., G. Gasparini, S. B. Fox, M. Toi, L. Martin, P. McCulloch, F. Pezzella, G. Viale, N. Weidner, A. L. Harris & L. Y. Dirix (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*, 32A, 2474-84.
- Wang, Z., T. Liu, G. Li & Z. Cao (2020) The exploration of new therapeutic targets for HPV-negative head and neck squamous cell cancer through the construction of a ceRNA network and immune microenvironment analysis. *J Cell Biochem*, 121, 3426-3437.
- Warner, K. G., G. Durham-Smith, M. D. Butler, C. E. Attinger, J. Upton & S. F. Khuri (1989) Comparative response of muscle and subcutaneous tissue pH during arterial and venous occlusion in musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg*, 22, 108-16.

- Wei, F. C., V. Jain, S. Suominen & H. C. Chen (2001) Confusion among perforator flaps: what is a true perforator flap? *Plast Reconstr Surg*, 107, 874-6.
- Weibel, E. R. & G. E. Palade (1964) New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol*, 23, 101-12.
- Wise, S. R., W. J. Harsha, N. Kim & R. E. Hayden (2010) Free flap survival despite early loss of the vascular pedicle. *Head Neck*, 33, 1068-71.
- Wolff, K. D. & F. Hölzle. 2011. *Raising of microvascular flaps*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Wolff, K. D., F. Holzle & H. Eufinger (2003) The radial forearm flap as a carrier for the osteocutaneous fibula graft in mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32, 614-8.
- Wolff, K. D., F. Holzle, A. Kolk, B. Hohlweg-Majert, T. Steiner & M. R. Kesting (2011) Raising the osteocutaneous fibular flap for oral reconstruction with reduced tissue alteration. *J Oral Maxillofac Surg*, 69, e260-7.
- Wolff, K. D., F. Holzle, A. Wysluch, T. Mucke & M. Kesting (2008) Incidence and time of intraoperative vascular complications in head and neck microsurgery. *Microsurgery*, 28, 143-6.
- Wolff, K. D., M. Kesting, D. Loffelbein & F. Holzle (2007) Perforator-based anterolateral thigh adipofascial or dermal fat flaps for facial contour augmentation. *J Reconstr Microsurg*, 23, 497-503.
- Wolff, K. D., T. Mucke, J. Lehmbrock, D. J. Loeffelbein, M. R. Kesting & F. Holzle (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, 123-6.
- Wolff, K. D., T. Mucke, A. von Bomhard, L. M. Ritschl, J. Schneider, M. Humbs & A. M. Fichter (2016) Free flap transplantation using an extracorporeal perfusion device: First three cases. *J Craniomaxillofac Surg*, 44, 148-54.
- Wolff, K. D., L. M. Ritschl, A. von Bomhard, C. Braun, C. Wolff & A. M. Fichter (2020) In vivo perfusion of free skin flaps using extracorporeal membrane oxygenation. *J Craniomaxillofac Surg*, 48, 90-97.
- Wolff, K. D., B. Uekermann, G. Matthes & E. Wartenberg (1998) Intracapillary haemoglobin oxygenation and interstitial pO₂ in venous flaps: an experimental study in rats. *Microsurgery*, 18, 324-30.
- Young, C. M. (1982) The revascularization of pedicle skin flaps in pigs: a functional and morphologic study. *Plast Reconstr Surg*, 70, 455-64.
- Yuen, J. C. & Z. Feng (2000) Monitoring free flaps using the laser Doppler flowmeter: five-year experience. *Plast Reconstr Surg*, 105, 55-61.
- Zhang, F., K. Fischer, E. Komorowska-Timek, M. Guo, D. Cui, W. Dorsett-Martin, H. J. Buncke & W. C. Lineaweaver (2001) Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg*, 46, 314-9.
- Zhang, F., L. Richards, M. F. Angel, J. Zhang, H. Liu, W. Dorsett-Martin & W. C. Lineaweaver (2002) Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg*, 55, 59-63.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Perforatortypen (Hallock 2003a).	- 10 -
Abbildung 2: Schematisch dargestellter Ablauf der Bildung eines neuen Blutgefäßes. Abbildung aus (Benedito 2010).	- 15 -
Abbildung 3: Gehobenes epigastrisches Lappentransplantat. Blauer Pfeil weist auf den Gefäßstiel mit A. und V. epigastrica, Abgänge aus A. und V. femoralis, modifiziert nach Mücke und Fichter.	- 19 -
Abbildung 4: Perforatortransplantat einer Ratte, schwarze Pfeile markieren die Perforatoren. - 20 -	
Abbildung 5: Eingezeichnetes epigastrisches Transplantat vor Hebung	- 23 -
Abbildung 6: Darstellung des gehobenen epigastrischen Gewebetransplantates. Der schwarze Pfeil weist auf den perfundierenden Gefäßstiel.	- 23 -
Abbildung 7: Gehobener Perforatorlappen basierend auf vier Perforatoren. Ia entspricht der Line alba.	- 25 -
Abbildung 8: Funktionsweise der Gewebe-Photospektrometrie (Krug 2007a).	- 27 -
Abbildung 9: Perfusionsmessung mit O2C Sonde.	- 30 -
Abbildung 10: Bildschirmansicht im Darstellungsmodus.	- 30 -
Abbildung 11: Darstellung der Gruppeneinteilung Gruppe I.	- 37 -
Abbildung 12: Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe I.	- 38 -
Abbildung 13: Darstellung der Gruppeneinteilung Gruppe 1.v.	- 40 -
Abbildung 14: Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe I mit VEGF- Applikation.	- 41 -
Abbildung 15: Darstellung Gruppeneinteilung Gruppe II und Gruppe IIv.	- 42 -
Abbildung 16: Darstellung Versuchsablauf Gruppe II und IIv.	- 43 -
Abbildung 17: Darstellung der planimetrisch gemessenen Nekrosezonen in Abhängigkeit von der Stieldurchtrennung des Gewebestiels nach erfolgter Transplantathebung an Tag 3, 5, 7 und 10. Die Unterschiede der Nekrosegröße waren signifikant mit Ausnahme der 7-Tages- Gruppe mit der 10-Tages-Gruppe ($p < 0.05$, $n = 24$).	- 45 -
Abbildung 18: Darstellung der gemessenen Werte durch die Laser-Doppler-Spektroskopie zu den Zeitpunkten präoperativ, nach Stielunterbindung sowie eine Woche nach Stielunterbindung.	- 48 -
Abbildung 19: Prozentuale Entwicklung der Werte zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der O2C Messungen. Die Grafik verdeutlicht die Änderung der Werte: 100% entspricht einem gleichgebliebenen Wert, eine Erhöhung der Werte bedeutet eine Zunahme der Differenz der Werte zwischen den Messungen während eine Verminderung für eine prozentuale Abnahme spricht.	- 49 -
Abbildung 20: Stielunterbindung nach 10 Tagen	- 50 -
Abbildung 21: Stielunterbindung nach 7 Tagen	- 50 -
Abbildung 22: Stielunterbindung nach 5 Tagen	- 50 -
Abbildung 23: Stielunterbindung nach 3 Tagen	- 50 -
Abbildung 24: Darstellung der Nekrosezone in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der VEGF- Applikation.	- 52 -

Abbildung 25: Darstellung der gemessenen O2C-Werte der verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der VEGF-Applikation.	- 54 -
Abbildung 26: Darstellung der histologischen Analyse der Gewebetransplantate. Die Pfeile markieren lymphozytäre Infiltrationen, die Sterne Myonekrosen innerhalb des Transplantates.....	- 56 -
Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung der verschiedenen Gewebetransplantate exemplarisch für die verschiedenen Gruppen. Die Pfeile weisen auf die angefärbten Mikrogefäße hin.....	- 57 -
Abbildung 28: Gruppe ohne VEGF: Nekrosezonen bei den Perforans-basierten epigastrischen Transplantaten der Ratte. Die Anzahl der Perforatoren wurde zunächst bei 3-4 belassen (links), auf 2 (beide Bilder in der Mitte) und 1 (rechts) reduziert.....	- 60 -
Abbildung 29: Darstellung der Nekrosezonen bei Perforatortransplantaten mit und ohne VEGF-Applikation.....	- 60 -
Abbildung 30: Ergebnisse der O2C Messungen der Perforatorgruppe, Bezug nehmend auf die Anzahl der Perforatoren.....	- 62 -
Abbildung 31: Histologische Darstellung der Gewebetransplantate mit signifikant höherer Anzahl an lymphozytärer Infiltration und Nekrosezonen bei geringerer Perforatoranzahl (links: 1 Perforator, rechts: 3 Perforatoren).....	- 63 -
Abbildung 32: Perforatorgruppe mit VEGF: Bild links Belassen von 3 Perforatoren, Bild mittig Reduktion auf 2 Perforatoren und Bild rechts Reduktion auf einen Perforator zur Durchblutung des epigastrischen Lappentransplantates.....	- 64 -
Abbildung 33: Immunhistochemische Untersuchungen der Perforatorlappen zeigen in der Gruppe der präoperativen VEGF Applikation eine deutlich stärkere Expression in der Färbung mit vWF-AK sowie CD31 AK im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne VEGF Applikation.....	- 66 -

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Laser-Gewebespektroskopie vor und nach Hebung des epigastrischen Transplantates sowie nach Stielunterbindung zur Testung der Autonomisierung.	- 47 -
Tabelle 2: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der perioperativen Werte gemessen durch die Laser-Doppler-Spektroskopie auf die Autonomisierung und Darstellung der prognostischen Bedeutung.	- 47 -
Tabelle 3: Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse bezogen auf die zeitlichen Intervalle zwischen den perioperativen Messungen unter Berücksichtigung der Messwerte auf die Entwicklung von Hautnekrosen.	- 49 -
Tabelle 4: Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit verschiedenem Zeitpunkt der VEGF-Applikation.	- 53 -
Tabelle 5: Evaluation der Unterschiede der Mikrogefäßdichte zwischen den verschiedenen Gruppen (AMC/Field/(n/mm ²))	- 58 -
Tabelle 6: Gefäßdichte der epigastrischen Lappen nach immunhistochemischer Färbung von CD 31 und vWF.	- 59 -
Tabelle 7: Einfluss der Anzahl der Perforatoren und VEGF Applikation auf die Nekrosegröße. Zwischen den einzelnen Gruppen, aber auch in Abhängigkeit von der VEGF-Applikation zeigen sich signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test.	- 61 -
Tabelle 8: Ergebnisse der O ₂ C Messungen: Die gemessenen Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung und Median (Range Minimum-Maximum).	- 62 -

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt einigen wichtigen Personen, die mich in der Zeit meiner Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Ein besonderes Dankeschön für die lehrreichen Jahre und geduldige Betreuung bei der Verwirklichung dieser Arbeit gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Thomas Mücke. Seine großartige Unterstützung und sein stetiges Engagement waren mir eine große Hilfe bei der Vollendung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Überlassung dieser interessanten und vielseitigen Arbeit sowie für die Bereitstellung sämtlicher Materialien, Operationsbestecke und Räumlichkeiten und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung einreichen zu dürfen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Andreas Fichter danke ich für die gute und konstruktive Zusammenarbeit im mikrochirurgischen Labor.

Dem ZPF-Team des Klinikum rechts der Isar danke ich für die Pflege, Visite und Mitbetreuung der Versuchstiere.