

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Ischämischen Präkonditionierung bei
der NMRI-Maus

Clarissa Antonia Hölzle

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. F. W. Hölzle

2. Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens

Die Dissertation wurde am 17.08.2010 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2010
angenommen.

Für Frank

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Mikrochirurgische Transplantate	5
1.2	Ischämie und Reperfusionsschaden	9
1.3	Möglichkeiten zur Reduktion des postischämischen Gewebeschaden	11
1.3.1	Thermische Methoden	11
1.3.2	Pharmakologische Methoden	12
1.3.3	Mechanische Methoden	14
2	Fragestellung und Zielsetzung	18
3.	Material und Methode	19
3.1	Auswahl des Tiermodells	19
3.2	Tiere und Tierhaltung	20
3.3	Versuchsaufbau	20
3.4	Randomisierung	24
3.5	Versuchsablauf	24
3.5.1	Durchführung der Messung mit dem O2C	25
3.5.2	Entnahme von Blut und Gewebeproben	25
3.5.3	Versuchsprotokolle	27
3.6	O2C-Messungen	28
3.6.1	Laser-Doppler-Spektroskopie	28
3.6.2	Gewebespektrometrie	29
3.6.3	Fehlerquellen	31
3.6.4	Darstellungsmodus des O2C-Programms und technische Daten	32
3.7	Zytokin-Messungen	33
3.8	Histologische Untersuchungen	33
3.9	Statistische Methoden	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	O2C Messungen	38
4.2	Zytokin-Messungen	40
4.3	Histologische Untersuchungen	44
5.	Diskussion	48
6.	Zusammenfassung	55
7.	Literaturverzeichnis	56
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	66
9.	Anhang	71
10.	Lebenslauf	72
11.	Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AU	Arbitrary Unit
F2	Flow (Blutfluss) in 2 mm Gewebetiefe
F8	Flow (Blutfluss) in 8 mm Gewebetiefe
Hb	Hämoglobin
Hb-Ox	Hämoglobinoxygenierung
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Hitzeschockproteine
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IL	Interleukin
IP	Ischämische Präkonditionierung
LDF	Laser Doppler Flowmetrie
log	logarithmisch
min, h, d	minute(s), hour(s), day(s)
MW	Mittelwert
O2C	Oxygen to see
OPS-Imaging	Orthogonale polarisierte spektrale Bildgebung
PAF	Platelet Activating Factor
PET	Positronenemissionstomographie
PTFE	Polytetrafluorethylene
Raw-Spec	Rohspektrum
rt- PA	recombinant human tissue factor Plasminogen Activator
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
SPS	Sticky Platelet Syndrome
Tx	Transplantat
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V2	Velocity (Blutflussgeschwindigkeit) in 2 mm Gewebetiefe
V8	Velocity (Blutflussgeschwindigkeit) in 8 mm Gewebetiefe

1 Einleitung

1.1 Mikrochirurgische Transplantate

Mikrochirurgische Transplantate dienen einem Gewebeersatz in Regionen, in denen es zu einem Verlust von Gewebe gekommen ist. Dies ist vor allem in der Tumorchirurgie der Fall, wenn nach der Tumorentfernung eine sofortige rekonstruktive Maßnahme im Sinne einer Defektdeckung erfolgen soll (REUTHER, 1992, S.24), aber auch bei posttraumatischen Zuständen mit Verlust von Haut, Schleimhaut, Muskulatur oder Knochen. Solche Rekonstruktionen werden zunehmend mit Hilfe eines mikrochirurgischen Lappentransfers vorgenommen. In Abbildung 1 sind die wichtigsten Spenderregionen dargestellt.

Mikrochirurgischer Gewebettransfer Spenderregionen

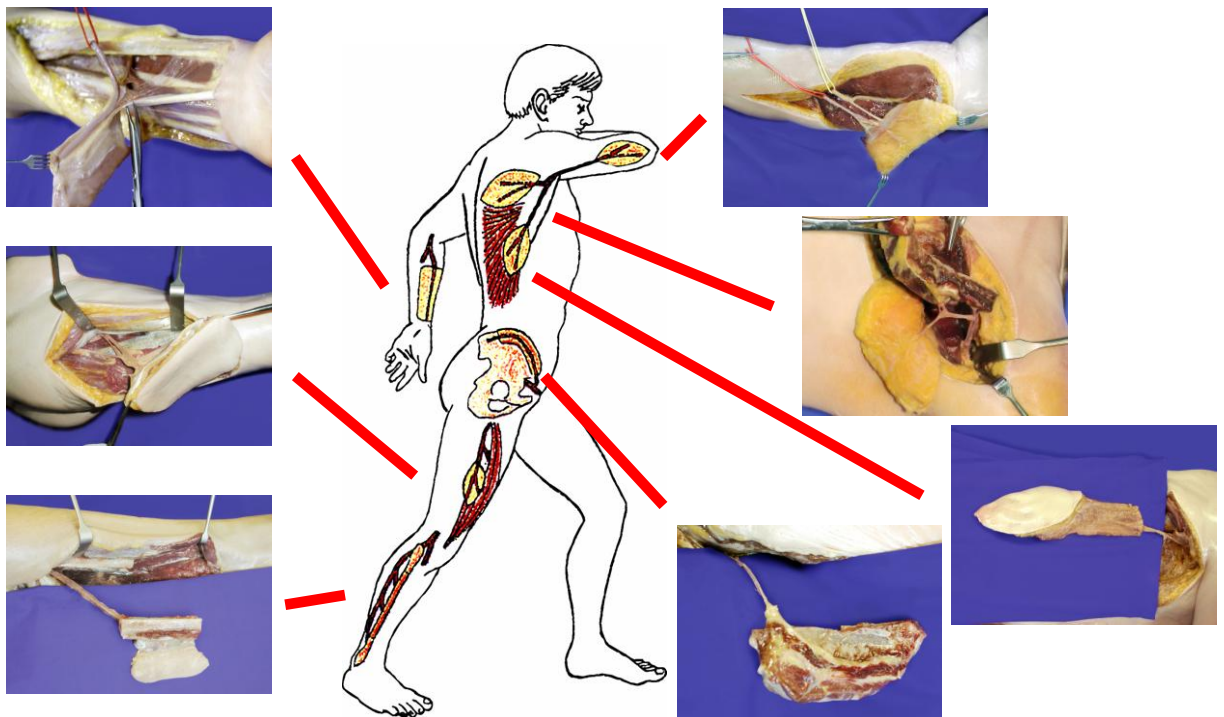


Abb.1: Gängige Spenderregionen für mikrochirurgische Transplantate, von unten links im Uhrzeigersinn: Fibula-Transplantat, M. vastus lateralis-Lappen,

Radialis-Lappen, Oberarm-Lappen, Skapula-Transplantat, Latissimus dorsi-Lappen, Beckenkamm-Transplantat.

Eine entscheidende Rolle in der Defektdeckung im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich spielen freie septocutane, myocutane und osteomyocutane Lappen, welche aus unterschiedlichen Spenderregionen gewonnen werden können. Mikrochirurgischer Weichteilersatz erfolgt regelmäßig durch den Einsatz von septocutanen und myocutanen Lappen (EHRENFELD und MAST, 2000, S.299; RIEDIGER und EHRENFELD, 1990, S. 39), zur suffizienten Rekonstruktion von knöchernen Defekten sind Transplantate mit Knochenmaterial erforderlich (KARCHER, 2000, S.322).

Mit dem zur Defektdeckung erforderlichen Gewebe werden aus der Spenderregion ein dieses Gewebe versorgendes arterielles Gefäß sowie eines zum venösen Abfluss gehoben. Diese Gefäße werden in dem zu rekonstruierenden Bereich an entsprechende Anschlussgefäße mikrochirurgisch anastomosiert, so dass eine suffiziente Durchblutung des Transplantates gewährleistet ist (Abb. 2). Nach der Hebung des mikrochirurgischen Transplantates am Spenderort werden die versorgenden Gefäße abgesetzt, und die Phase der Ischämiezeit, das heißt eine Phase ohne Durchblutung, beginnt. Diese beträgt in der Regel etwa 2 bis 4 Stunden, je nachdem, ob zuerst anastomosiert oder das Transplantat eingebracht wird. Nach der mikrochirurgischen Anastomosierung im Empfängerbereich kommt es zu einer Wiederdurchblutung des Transplantates, und die Reperfusionphase beginnt.

Diese zwei Phasen im Verlauf der Transplantation - die Ischämiezeit und die Reperfusionphase – sind wichtige Phasen, in denen es zu Gewebsschädigungen kommen kann. Von etwaigen Gewebsschäden, die im Verlauf dieser Phasen entstehen können, hängt im Wesentlichen auch der Erfolg der Transplantation ab. Dieser ist vor allem an einer suffizienten Durchblutung und daraus folgender guter Transplantateinheilung und – überlebensrate festzumachen.

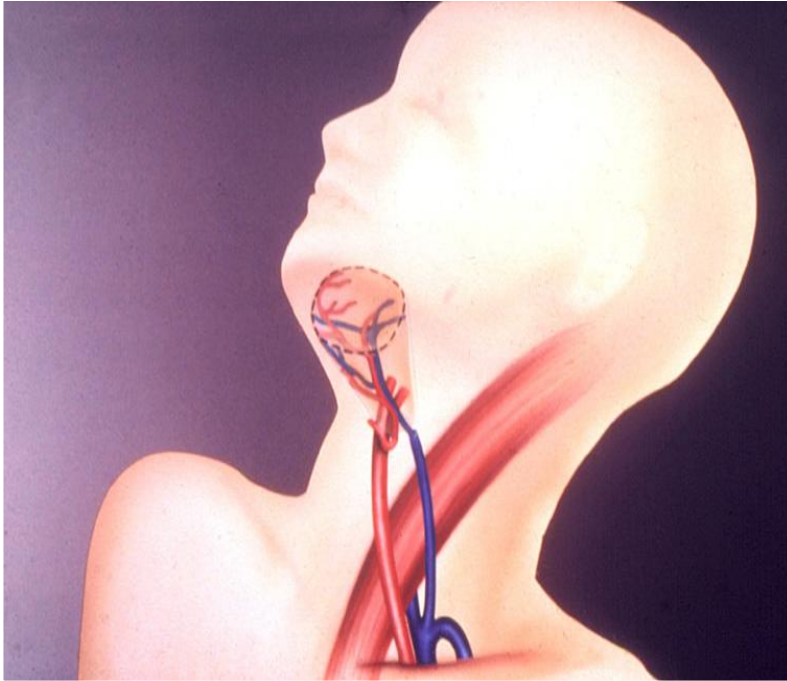


Abb. 2: Schematische Darstellung des mikrochirurgischen Gewebetransfers mit an die Halsgefäße anastomosiertem Transplantat.

Komplikationen nach einer Transplantation werden meist durch Perfusionsstörungen im Transplantat hervorgerufen, wobei die Ursache dafür nicht immer sicher zu benennen ist. Eine frühzeitige Revision der Komplikationen ist oftmals die einzige Möglichkeit einen Transplantatverlust zu verhindern.

Insgesamt gibt es in der Literatur verschiedene Aussagen bezüglich der Erfolgs- und Komplikationsraten nach Transplantation. So werden Erfolgsraten bis zu 95% angegeben (JONES, 1992, S.783; NELIGAN, 1993, S.162; HIRIGOYEN et al., 1995, S.725; HIDALGO et al., 1998, S.724; LAM et al., 2002, S.933; SUH et al., 2004, S.964). Dabei ist zu beachten, dass die angegebenen Erfolgsraten auch Revisionen etwaiger Komplikationen beinhalten. Komplikationen ohne erfolgreiche Revision führen häufig zu erheblichen und schwerwiegenden Beeinträchtigungen der betroffenen Patienten. In der Literatur finden sich Angaben bezüglich der Komplikationsraten von 15 bis zu 25% (LIDMAN und DANIEL, 1981, S.217; NELIGAN, 1993, S.162; DISA et al., 1999, S.97).

Wichtig für die Erfolgsrate sind die operative Technik der Lappenhebung und Anastomosierung sowie die Vermeidung und Früherkennung von Komplikationen. Zur Erkennung einer für die meisten Komplikationen verantwortlichen Perfusionsstörung und Beurteilung der Lappenvitalität steht in den meisten Fällen die klinische Beurteilung im Vordergrund (HIRIGOYEN et al., 1995, S.723). An wichtigen Beurteilungskriterien sind hier Lappenfarbe und Rekapillarierungszeit zu nennen. Dies setzt allerdings eine langjährige Erfahrung des Untersuchers voraus. Zudem stellen sich viele Veränderungen morphologisch erst zu einem sehr späten Zeitpunkt dar. Daher wurde seit Beginn des Lappentransfers nach einer suffizienten Methode des Monitorings gesucht. Einige Verfahren kommen zum Einsatz, wie die Laser Doppler-Flowmetrie (YUEN und FENG, 2000, S.55), Doppler Sonografie (SOLOMON et al., 1986, S.40), farbkodierte Duplexsonografie (SCHÖN et al., 2002, S.319), elektromagnetische Flowmetrie (ERRIKSON et HEDEN, 1988, S.229), Fluoreszenz- Angiografie (MOTHES et al., 2004, S.1018), 3-D Ultrasound (LANGER et al., 2001, S.1434), Sauerstoffpartialdruckmessung (KAMOLZ et al., 2002, S.488), Phosphoreszenz- und Lumineszenztechniken (LUBBERS, 1996, S.65), Photoplethysmografie (FUTRAN et al., 2000, S.659), Pulsoxymetrie (STRAUSS et al., 1994, S.81), Gewebsspektrometrie (SCHULTZE-MOSGAU et al., 2003, S.293), Temperaturmessungen (KAUFMAN et al., 1987, S.34), pH-Messungen (WARNER et al., 1989, S. 109) und Hämatokritkontrollen (KERRIGAN und DANIEL, 1983, S. 520). Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich auch mit der Kombination aus Doppler-Flowmetrie und Gewebsspektrometrie (HOLZLE et al., 2005, S.293; 2006, S.25; 2009, S.21). Diese Methoden tragen dazu bei, eine Früherkennung von Komplikationen zu optimieren.

Ein dringenderes Ziel in der Transplantationschirurgie ist allerdings, eine Senkung der Komplikationsrate zu erreichen. Hier liegen die Ansatzpunkte vor allem im Bereich der erwähnten Ischämie- und Reperfusionsphase.

1.2 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Zwischen der Hebung eines mikrochirurgischen Transplantates an einem entfernt gelegenen Spenderort und seinem Wiederanschluss in der Kopf-Halsregion mit Perfusion des Lappens vergeht durchschnittlich eine Ischämiezeit von zwei bis vier Stunden. Bei der Reperfusion des Transplantates, also dem initialen Wiedereinströmen von Blut in das zuvor ischämische Gewebe, entstehen regelmäßig so genannte postischämische Gewebeschäden, die maßgeblich für die perioperative Morbidität mit Wundheilungsstörung bis hin zum Transplantatverlust verantwortlich sind.

Die kritische Ischämiezeit, das heißt die maximal tolerierbare Ischämiezeit eines Gewebes, liegt gewebsspezifisch in einem Zeitraum von zwei bis acht Stunden und zeigt eine Temperaturassoziation (PICARD-AMI et al., 1990, S.739; ECKERT und SCHNACKERZ, 1991, S.82). Je höher die Differenzierung des Gewebes ist, desto niedriger ist die Ischämietoleranz. In tierexperimentellen Studien ergab eine drei- bis vierstündige Ischämie einen irreversiblen Gewebeschaden in Haut und quer gestreifter Muskulatur (HARRIS et al., 1996, S. H994; NOLTE, 1994, S. H1320).

Durch das Absetzen der Lappengefäße am Spenderort - und der damit beginnenden Ischämiezeit - tritt zunächst ein Sistieren des Blutflusses in dem Transplantat ein. Dadurch kommt es zu einer Anoxie des Gewebes und im weiteren Verlauf zu einem anaeroben intrazellulären Metabolismus. Hierdurch sinkt der intrazelluläre pH-Wert und Laktat akkumuliert. Die Bereitstellung von ATP sinkt, und eine Ansammlung von Stoffwechsel-Metaboliten in der Zelle und der extrazellulären Matrix tritt ein. Durch diese toxischen Metabolite kommt es zu einer Dysintegrität der Zellmembran und zu komplexen Reaktionen durch Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinen. Hier werden in der Literatur vor allem Mediatoren wie Leukotrien B₄, die Zytokine TNF- α , IL-1b, IL-6, und IL-8 beschrieben (NOSE, 1993, S.306). Durch diese Botenstoffe werden Leukozyten aktiviert, wandern in den ischämischen Bereich, rollen am Gefäßendothel entlang, es kommt zu einer Adhäsion über Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine und β 2-Integrine, und schließlich zu einer Emigration in das umgebende Gewebe. Dort kommt es durch Freisetzung von proteolytischen Enzymen und freien Radikalen schließlich zu einem

Gewebsschaden. Zudem treten eine Schwellung des Endothels und ein interstitielles Ödem auf, welche zu einer Verengung des Kapillardurchmessers führen. Laut MORRIS et al. (1996, S. 706) ist das Ausmaß des postischämischen Schadens direkt proportional zur Ischämiedauer. Abbildung 3 zeigt den Verlauf von der Leukozytenaktivierung bis zum Zustandekommen des Gewebeschadens.

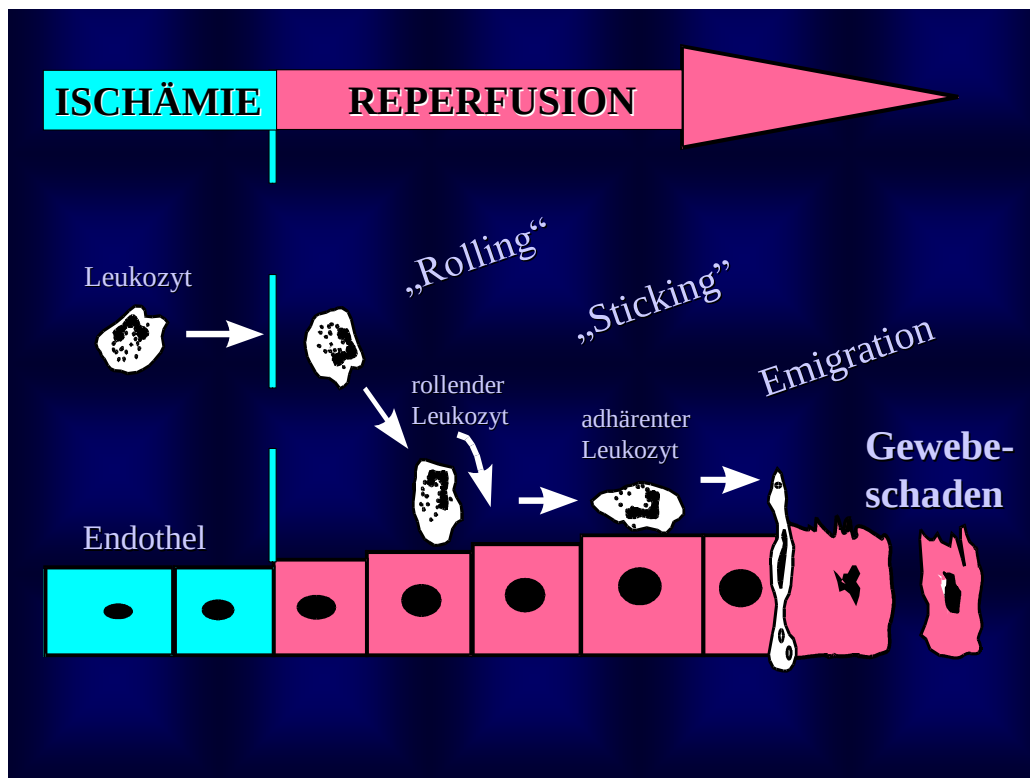


Abb. 3 : Rolling, Sticking und Emigration der Leukozyten in das Endothel mit Initiation des Gewebeschadens.

Durch Freigabe des Blutflusses nach erfolgter Anastomosierung und nachfolgender Reperfusion des Transplantates kommt es im optimalen Falle zu einem normalen Blutfluss und einer Wiederherstellung der zellulären Stoffwechselfunktion und Integrität des Gewebes. Laut JOHNSON und BARKER (1992, S.800) lassen sich zwei Zonen der Schädigung unterscheiden. Als erste Zone ist der Bereich der Anastomose beschrieben, in dem es gehäuft zu Schäden durch Thrombosierung der Anastomosengefäße kommen kann. Die zweite Zone befindet sich in dem Gewebe des Lappens im Bereich der Mikrozirkulation, wo die oben beschriebene Leukozytenaktivierung und –

adhäsion zu einem Gewebeschaden führen kann. Zudem akkumulieren mit der Reperfusion Leukozyten, Thrombozyten und andere inflammatorische Zellen durch die chemotaktischen Signale und freien Radikale. Die Akkumulation und Adhärenz der Zellen führt zu einer weiteren Einschränkung der Mikrozirkulation vor allem im Bereich der postkapillären Venolen. Zusätzlich wird die Bildung von inflammatorischen Mediatoren wie Leukotrien B₄, Thromboxan A₂, TNF- α , IL-6 , IL-8 , IL 1 β und Platelet-Activating-Factor (PAF) durch eine durch den Ischämieereiz erfolgte Akkumulation von intrazellulärem Calcium maximiert. Diese Mediatoren gelten als Trigger für den Reperfusionsschaden (PALACE et al., 1993, S.146).

1.3 Möglichkeiten zur Reduktion des postischämischen Gewebeschadens

Verschiedene Strategien zur Attenuierung des postischämischen Reperfusionsschadens basieren auf unterschiedlichen Ansatzpunkten, die allesamt die Protektion des postischämischen Gewebes zum Ziel haben.

Die drei wichtigsten Möglichkeiten werden im Folgenden dargestellt, wobei die dritte Strategie, die Ischämische Präkonditionierung (IP), für die klinische Anwendung im Fachgebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie das größte Potential zu haben scheint und deshalb Grundlage dieser experimentellen Untersuchungen ist.

1.3.1 Thermische Methoden

Bezüglich der thermischen Methoden gab es in den letzten Jahren viele Studien, die belegen, dass durch die thermische Behandlung von Transplantaten unter Erzeugung einer Hyperthermie Ischämie- und Reperfusionsschäden vermindert werden können. Durch Hyperthermie, aber auch Ischämie, Stress und Traumen kommt es auf zellulärer Ebene zur Expression von sogenannten Hitzeschockproteinen (HSP), welche in diesen Situationen zum Schutz von Proteinen vermehrt synthetisiert werden. Es gibt 5 Klassen: HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 und die sogenannten small heat-

shock proteins (sHSPs). Einige der Hitzeschockproteine aller Klassen haben Chaperon-Eigenschaften, daneben führen sie auch zu einer Wiederherstellung von Homöostase in Zellen und Organismus. Die Synthese der HSP ist streng reguliert durch sogenannte Heat Shock Factors (HSF).

Durch eine Applikation von Wärme in verschiedenen Transplantatmodellen können HSP induziert werden und eine protektive Wirkung auf Ischämie-/Reperfusionsschäden ausüben. KOENIG et al. (1992, S. 660) applizierten 45 °C Wärme für 30 Minuten auf einen Hautlappen. Nach sechsstündiger Erholungsphase wurde in dem gehobenen Lappen eine signifikante Erhöhung von HSP nachgewiesen.

Eine systemische Applikation von 42 °C für 30 Minuten sechs Stunden postoperativ führte bei myokutanen Lappen zu einer Verbesserung der Hautüberlebensrate unter signifikanter Erhöhung von HSP 72 in der Haut (WANG et al., 1998, S. 780).

RUCKER et al. (2001, S.453) konnten zeigen, dass durch lokale Wärmeapplikation bei osteomyokutanen Lappen die Bildung von HSP 32 induziert und die nutritive Durchblutung des Lappens durch kapilläre Dilatation verbessert werden kann, was auf eine vasoaktive Aktivität von HSP 32 zurückgeführt wird. Auch die inflammatorische Reaktion nach Reperfusion konnte durch Wärmeapplikation vermindert werden (RUCKER et al., 2001, S.299).

Durch präoperative Kühlung (-18 °C) und Erwärmung mit 45 °C warmem Wasser, appliziert in drei Zyklen, war es möglich, die Überlebensraten von Hautlappen zu verbessern (SALMI et al., 1999, S. 165).

1.3.2 Pharmakologische Methoden

Es gibt zahlreiche Studien über pharmakologische Interventionen zur Verminderung von Ischämie- und Reperfusionsschäden. Dabei sind grundsätzlich verschiedene Ansätze beschrieben.

Zum einen besteht die Möglichkeit, pharmakologisch die Bildung von Hitzeschockproteinen zu induzieren, welche eine Protektion der Zellen gegenüber oxidativen Schäden bewirken.

Zum anderen sind die Durchblutungs- und Gerinnungseigenschaften ein wichtiger Ansatzpunkt zur Verminderung eines postischämischen Schadens. Im Folgenden werden die wichtigsten Vertreter beider Gruppen aufgeführt:

Induktion von Hitzeschockproteinen(HSP):

Low-dose Cyclosporine oder FK 506:

Der Einsatz von low-dose Cyclosporinen oder dem Makrolid FK 506 (Tacrolimus, Fujimycin) führt zu einer Expression von HSP 70 und zur Abnahme von Ischämie-/ Reperfusionsschäden (YANG et al., 2001, S. 1758).

Herbimycin:

Herbimycin A als Tyrosinkinase-Inhibitor kann die Expression von HSP 70 und HSP 72 induzieren. Daneben korreliert mit der Herbimycingabe eine protektive Wirkung auf die Zellen gegenüber Stress (MORRIS et al., 1996, S. 711).

Eingriff in die Durchblutungs- und Gerinnungseigenschaften

Heparin:

Heparin hemmt als Kofaktor von ATIII die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und vermindert die Assoziation von Thrombozyten. Es wirkt antikoagulativ.

Lokal angewandt reduziert es die Thromboserate sowohl arteriell als auch venös in Anastomosen (CONRAD und ADAMS, 2001, S. 2089).

Aspirin:

Aspirin hemmt die Cyclooxygenase und inhibiert auf diesem Wege die Bildung des Vasokonstriktors Thromboxan. Zudem wirkt Aspirin antiphlogistisch. Low-dose Aspirin (5mg/ kg Körpergewicht) hat in Tiermodellen eine Bildung von venösen Thromben in Anastomosen gehemmt (PETER et al., 1997, S. 1118). Hohe Dosen (200mg/ kg Körpergewicht) von Aspirin können die Überlebensrate von Lappen durch einen antiphlogistischen Effekt verbessern (SHALOM und WESTREICH, 2001, S. 118).

Hyperbares O₂:

Hyperbares O₂ verbessert den O₂-Transport in ischämischen Lappen und vermindert die Bildung von Ödemen (BILL et al., 2001, S.762). Eine

Verbesserung der distalen Perfusion eines Lappens durch Applikation von hyperbarem O₂ konnte mittels eines Laser- Dopplers nachgewiesen werden (ZAMBONI et al., 1992, S. 341).

VEGF (vascular endothelial growth factor):

VEGF induziert die Angiogenese. Dem Faktor wird eine endothelprotektive Rolle zugesprochen. Die Applikation von VEGF führt zu einer Reduktion von Ischämie- Reperfusionsschäden gegenüber einer Kontrolle und ebenfalls gegenüber Heparin (KRYGER et al., 1999, S.174). Vermutlich beruht die Wirksamkeit auf der Induktion der Angiogenese (PADUBIDRI und BROWNE, 1996, S. 609).

Desweiteren kommen Prostacycline/ Thromboxan zur Verringerung des postischämischen Gewebeschadens zum Einsatz, ebenso wie die Thrombolytika Urokinase, Streptokinase und rt-PA (recombinant human tissue factor plasminogen activator). Auch Ca-Kanal-Blocker wie Verapamil und Nifedipine führen durch Verminderung von Vasospasmen zu verbesserten Lappenüberlebensraten.

Antioxidative Strategien können durch das Scavenging von freien Sauerstoffradikalen den postischämischen Reperfusionsschaden sowohl experimentell als auch klinisch vermindern. Hier kommen die Superoxide Dismutase und Katalase zum Einsatz (STEWART et al., 1994, S.985).

1.3.3 Mechanische Methoden

Bei den mechanischen Maßnahmen zur Verringerung von Ischämie-Reperfusionsschäden ist vor allem die Methode der Ischämischen Präkonditionierung zu nennen. Des Weiteren gibt es Versuche mit künstlichen Implantaten und dem Einsatz von Fibrinkleber.

Die Methoden werden im Folgenden beschrieben:

Ischämische Präkonditionierung (IP)

Die IP stellt ein noch sehr junges Therapiekonzept dar, welches die Verbesserung der Ischämietoleranz des ischämisch kompromittierten Gewebes zum Ziel hat. Heute weiß man, dass die Zytokine TNF- α , Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 eine zentrale Rolle für die Propagation des Reperfusionsschadens spielen. Untersuchungen zeigen, dass eine IP, d.h. die kurzfristige Induktion einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion vor dem eigentlichen Ischämie-Ereignis, den postischämischen Gewebeschaden und damit die Morbidität signifikant senken kann (ATTKISS et al., 1999, S.225; ZAHIR et al., 1998, S.433).

Die Freisetzung der o.g. Mediatoren kann dabei signifikant vermindert werden, wobei vor allem der Blockade von TNF- α eine Bedeutung zuzukommen scheint. Daneben kommt es zu einer Reduktion von Vasospasmen und damit zu einem verbesserten Reflow bei IP (WANG et al., 1996, S. 327).

Erstmals im Jahre 1986 stellten MURRY et al. (1986, S.1130) den protektiven Effekt von IP im Myokard fest. Im Jahre 1992 zeigten MOUNSEY et al. (1992, S.318), dass auch in Skelettmuskulatur ein solcher Effekt nachzuweisen ist. In weiteren Studien wurden unterschiedliche Ischämiezeiten im Rahmen der IP angewandt. Dabei wiesen MATSUMURA et al. (2001, S. 60) eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der Lappen durch ein Abklemmen der Gefäße für 20 Minuten mit folgender Reperfusion von 40 Minuten vor Lappenhebung nach. Bei der IP mit verschiedenen Zeitprotokollen hat sich gezeigt, dass drei zehnminütige Zyklen mit anschließender zehnminütiger Reperfusion vor einer vierstündigen globalen Ischämie einen besseren Effekt auf die Überlebensrate von myokutanen Lappen haben als fünfminütige Zyklen (ZAHIR et al., 1998, S. 434).

Postkonditionierung

Die Postkonditionierung wird definiert als eine kurze Serie von wiederholten Zyklen von Reperfusion und Reocclusion nach einem längeren ischämischen

Insult. Zu diesem neuen Konzept gibt es bereits einige Studien wie von PINHEIRO et al. (2009, S.31), welche am Rattenmodell einen Schutzeffekt auf die Kontraktilität des Myokards durch Postkonditionierung nach Ischämie nachweisen konnten. Eine Studie von MOON et al. (2008, S.533) wies signifikant geringere Gewebnekrosen und eine deutlich verminderte inflammatorische Antwort des Gewebes eines Hautlappens am Rattenmodell nach Postkonditionierung nach. Hier wurden Zyklen von 6 x 15 sec Reperfusion und Reokklusion über 3 min anschließend an eine vierstündige Ischämie als Protokoll der Postkonditionierung eingesetzt. Hier wird ursächlich für die Verminderung des postischämischen Gewebeschadens vor allem eine Reduktion des Vasospasmus von terminalen Arteriolen angenommen.

Mikroprothesen

Es gibt einige Studien, die den Einsatz von Mikroprothesen beim mikrochirurgischen Lappentransfer untersucht haben, wobei sowohl die zuführenden Arterien als auch die abführenden venösen Gefäße durch Prothesen ersetzt wurden. Zur Anwendung kamen vor allem Polytetrafluorethylene (PTFE). Die meisten Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von PTFE- grafts durch die erhöhte Thrombogenität des Materials nicht zu einer Verbesserung der Lappendurchblutung führt (SHEN et al., 1988, S. 310). Eine Beschichtung des PTFE mit Tridocyclomethylammoniumchlorid (TDMAC)-Heparin kann jedoch die Thrombogenität des Materials verringern, und der Einsatz solch beschichteter Prothesen verbessert so signifikant die Lappenüberlebensrate gegenüber konventionellen Anastomosen (RITTER et al., 1997, S.891).

Fibrinkleber

Die Grundüberlegung beim Einsatz von Fibrinkleber in der Mikrochirurgie besteht darin, die aufwendige und zeitraubende konventionelle Nahttechnik der Anastomosen durch einen schnelleren und einfacheren Nahtschluss mit Kleber zu ersetzen.

In Studien zeigte sich, dass beide Methoden vergleichbar erfolgreich sein können (BOWEN et al., 1996, S. 797). Von Bedeutung ist dabei, dass das

Verwenden von Fibrinklebern auf thrombinfreier Grundlage obligat ist, um den thrombosierenden Effekt durch Thrombin zu vermeiden (DRAKE et al., 2000, S.524).

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Von entscheidender Bedeutung beim Einsatz von mikrochirurgischen Transplantaten sind eine erfolgreiche Transplantation und eine gute Einheilung. Regelmäßig kommt es allerdings zu inakzeptablen Komplikationen in bis zu 20 % der Fälle, die auch im postischämischen Gewebeschaden begründet liegen. Es stellt sich daher die Frage, ob die Vorbehandlung eines Transplantates durch IP zur Verminderung dieses Schadens führen und falls ja, welches Konditionierungsprotokoll die besten Ergebnisse bringen kann.

Ein Tiermodell mit NMRI-Mäusen sollte Aufschluss über eine mögliche Reduktion der Schädigungsparameter in Muskulatur und Serum bei einem osteomyokutanen Transplantat sowie Informationen über Perfusion und Oxygenierung des konditionierten Transplantates geben.

Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es, Antworten auf folgende Fragen zu finden:

1. Kommt es durch das Manöver der IP zu einer Verminderung des histomorphologischen Gewebeschadens im Weichgewebe?
2. Haben Unterschiede in der Frequenz und/ oder Dauer der IP ein unterschiedliches Maß an Protektion bzgl. des postischämischen Schadens?
3. Lassen sich diese Veränderungen auch systemisch über die Freisetzung von Zytokinen oder löslichen Adhäsionsmolekülen nachweisen?
4. Wie wirken sich die unterschiedlichen Präkonditionierungsmodelle auf Perfusion und Oxygenierung des Transplantates im weiteren postoperativen Verlauf aus?

3. Material und Methode

3.1 Auswahl des Tiermodells

Die Transplantation von autogenem Körpergewebe mittels mikrochirurgischer Technik kann in seiner Komplexität nur an einem hierfür geeigneten lebenden Organismus durchgeführt und untersucht werden. Gerade die Interaktion der Blutzellen mit dem Endothel der Gefäße und die Folgen für das perivaskuläre Gewebe können nur an einem intakten Organismus erfasst werden. Insbesondere die Interaktionen der freigesetzten Mediatoren, wie z.B. Zytokine, setzen die Integrität der einzelnen Gewebeverbände voraus.

Keine der oben genannten Fragen ließen sich ohne den Tierversuch beantworten: Weder wiederholte Gewebeprobenentnahmen an transplantierten Lappen noch serologische Messungen des venösen Effluates nach Transplantation der Lappen können in vitro vorgenommen werden. Auch das non-invasive Monitoring der kapillären Hämoglobinoxygenierung sowie des kapillären Blutflusses (mit dem O2C-Gerät) als derzeit aktuellstes Instrument des klinischen Monitorings kann nur an einem für Ischämie und Reperfusion etablierten Tiermodell festgestellt werden. Die Gewebeanalysen, beim Patienten weder aus Gründen der technischen Durchführbarkeit noch der ethischen Vertretbarkeit zu erhalten, sind jedoch für das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge in vivo von entscheidender Bedeutung. Da für die Analyse der zu untersuchenden Mediatoren bisher nur Maus und Mensch in vollem Umfang zur Verfügung stehen, verblieb für diese Untersuchung als Tierspezies nur die Maus.

Die Auswahl für die NMRI – Maus war nahe liegend und pragmatisch, denn als behaarte Universalmaus mit genetischer Vielfalt erlaubt sie wegen ihrer überdurchschnittlichen Größe die Entnahme einer ausreichenden Blutmenge und damit die sichere quantitative Analyse der zu untersuchenden Mediatoren.

Nach Enthaarung des Hinterlaufes kann die Bestimmung der Hämoglobin-Oxygenierung durch Gewebespektrometrie sowie die Messung der Durchblutungsparameter mittels Laser-Doppler-Spektroskopie erfolgen.

Der Vorteil, die Untersuchungen in der Spezies „Maus“ durchzuführen, bestand darin, dass die zu untersuchenden Mediatoren bei dieser Spezies bereits

bekannt sind, und daher entsprechende Antikörper gegen diese Moleküle zur Verfügung stehen. Die Durchführung der experimentellen Maßnahmen bei der Maus erlaubt, die biologische Bedeutung von leukozytären, thrombozytären und/oder endothelialen Adhäsionsmolekülen durch die Blockade mit spezifischen monoklonalen Antikörpern beim Ischämie-Reperfusionsschaden gezielt zu evaluieren. Somit erlaubt es dieses Tiermodell in technisch einfacher Weise und ohne Verwendung größerer Versuchstiere, die oben genannten Fragestellungen vollständig zu bearbeiten und zu beantworten.

3.2 Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 280 weibliche NMRI-Mäuse in einem Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht von 30-35 g. Die Tiere stammten aus der Züchtung der Firma Charles River-Wiga (Sulzfeld, Deutschland). Die Tierhaltung während der Versuchsdurchführung übernahm die Zentrale Versuchstierhaltung Medizin der Ruhr-Universität-Bochum.

Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen in voll klimatisierten Räumen bei kontrolliertem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Temperatur betrug etwa 21° C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55%. Die Tiere erhielten Wasser und Standardfutter der Firma Altronin ad libidum. Die Unterbringung erfolgte maximal zu fünf Tieren in einem Käfig der Größe 45,4 x 29 x 21 cm.

Die Lieferung der Tiere erfolgte routinemäßig einige Tage vor Beginn der Versuche, damit eine Gewöhnung an die neue Umgebung erfolgen konnte. Alle Eingriffe fanden in einer intraperitonealen Narkose mit Ketanest-Rompun statt.

3.3 Versuchsaufbau

Bei diesem Tierversuchsmodell sollte der Hinterlauf der Maus als ein osteomyokutanes Transplantat herangezogen werden, das über die A. und V. femoralis gestielt ist. In Vorversuchen wurde deutlich, dass die alleinige Ligatur der Vasa femoralia aufgrund von Kollateralkreisläufen nicht ausreichend ist, um eine vollständige Ischämie der „osteomyokutanen“ Extremität zu

gewährleisten. Deshalb erfolgte die Ischämie dieser Extremität bei der narkotisierten Maus durch eine Ligatur des Oberschenkels.

In den Vorversuchen mit 70 NMRI-Mäusen zur Optimierung des Tiermodells zeigte sich ferner, dass eine Ischämiezeit von vier Stunden notwendig ist, um ein objektiv nachprüfbares Schädigungsmuster zu erzielen. Dieses galt es anhand der Konditionierungsprotokolle zu reduzieren. Bei den Zytokinuntersuchungen mittels Immunoassay (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) war das sogenannte KC, das dem menschlichen Interleukin 8 entspricht, von den in den Vorversuchen untersuchten Interleukinen am stärksten ausgeprägt und somit für das Monitoring bei den weiteren Versuchen prädestiniert. Von den Endothelmarkern traf dies auf das sE-Selektin zu.

Nach Reperfusion sollten nicht nur die aus dem Transplantat ausgeschwemmten Mediatoren gewonnen, sondern auch Gewebeproben von Muskulatur für die histologische Aufarbeitung entnommen werden.

Die Wahl der Untersuchungszeitpunkte wurde an frühere Untersuchungen bei IR mit der Ergänzung angelehnt, dass die Zeitpunkte 48 h und 96 nach Ischämie mit aufgenommen wurden, da der postischämische Gewebeschaden nach 24 h häufig noch nicht in seiner vollständigen Größe ausgebildet war. Damit gab die Zahl der Untersuchungszeitpunkte die Zahl der Versuchseinheiten vor. Die serologischen Untersuchungen der Zytokine sowie der löslichen Adhäsionsmoleküle konnten aus Gründen des für die Bestimmung notwendigen Blutvolumens (ca. 1 ml) immer nur einmalig abgenommen werden (Blutvolumen einer 35 g schweren NMRI-Maus: ca. 2,5 ml). Nach der Entnahme von Blut und Muskulatur wurden die Tiere deshalb in tiefer Narkose euthanasiert. Die Muskelentnahmen erfolgten ausschließlich im ischämischen Gewebe.

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

- I. Kontrollgruppe (ohne Manöver der IP),
- II. Versuchsgruppe mit IP von 5 min Ischämie und 5 min Reperfusion (IP 5/5),
- III. IP 10/10 und
- IV. IP 2 x 5/5 (d.h. 5 min Ischämie gefolgt von 5 min Reperfusion zweimal in Folge).

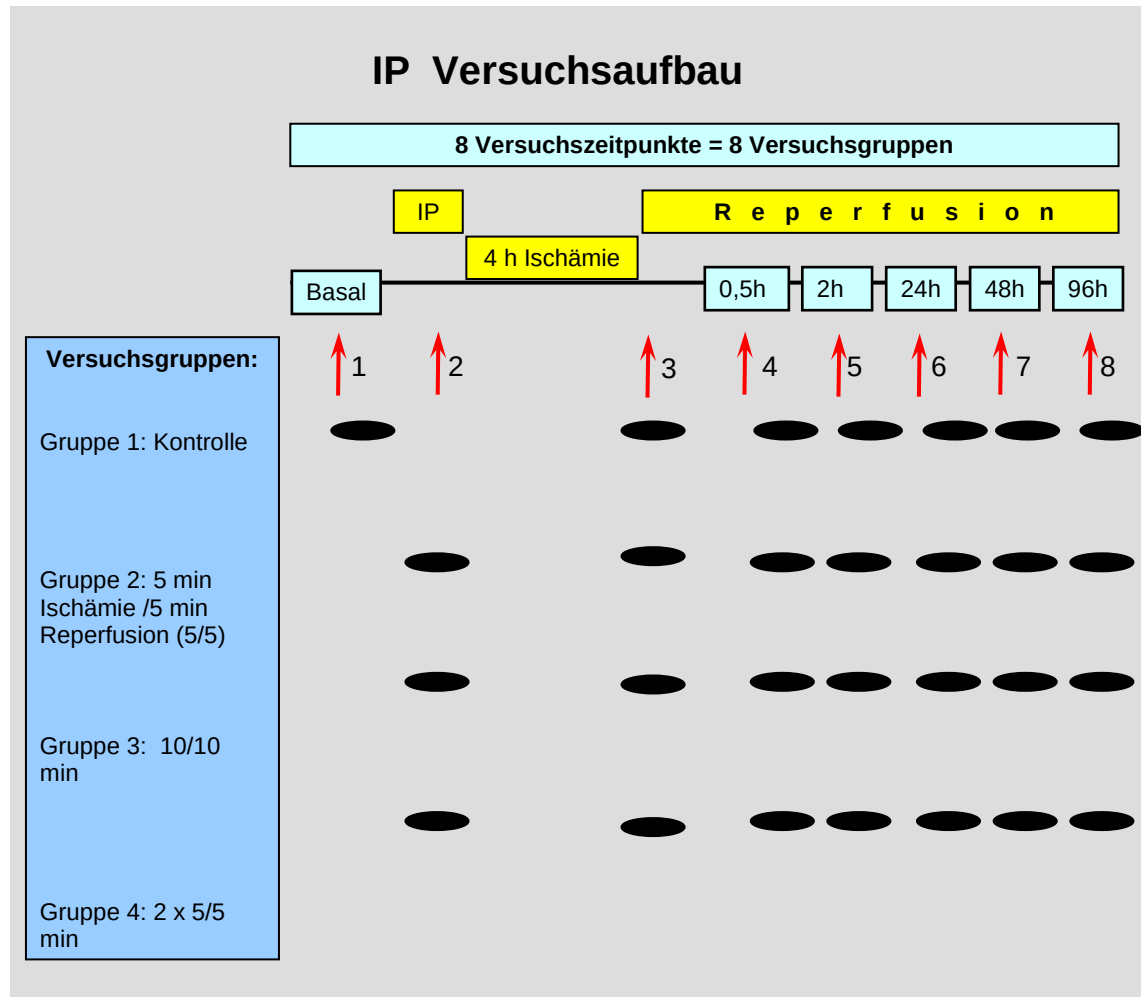
Damit ergaben sich aus der Zahl der Versuchszeitpunkte acht Versuchsansätze, welche einerseits für die Kontrollgruppe, andererseits für die IP-Behandlungsgruppen II., III. und IV. durchgeführt werden mussten. Aus statistischen Gründen wurden 10 Tiere pro Gruppe benötigt (bei 5 % -igem Fehler und zweiseitigem Test sowie einer Power von 90 %).

Der Versuch begann mit der Erfassung der Referenzparameter zum Zeitpunkt „basal“ (Abb. 1). Hier reichte die Gewinnung der Parameter an einer repräsentativen Gruppe von 10 Mäusen aus, so dass drei Versuchsgruppen eingespart werden konnten. Beim zweiten Versuchszeitpunkt nach der IP konnten ebenfalls die Mäuse der Kontrollgruppe eingespart werden, denn hier hat sich im Vergleich zur „basal“ – Gruppe nichts verändert. Somit ergaben sich 28 Versuchsgruppen mit jeweils zehn Versuchstieren pro Gruppe.

Abbildung 4 gibt einen Überblick über das experimentelle Protokoll und fasst das Studiendesign zusammen.

Protokoll: Experimentelle Studie

Ischämische Präkonditionierung vor Ischämie-Reperfusion



Zu jedem Versuchszeitpunkt: Probengewinnung: Serum (Zytokine, Adhäsionsmoleküle)
Gewebe (Muskel)
Noninvasive Messungen O2C (Hämoglobin-Oxygenierung, Hämoglobin-Konzentration, Flow, Velocity)

Abb. 4 Experimentelles Protokoll der IP bei Ischämie und Reperfusion am Hinterlauf der NMRI - Maus. Anzahl der Mäuse pro Gruppe (n=10).

3.4 Randomisierung

Die Versuchsgruppen wurden vor Versuchsbeginn mit einem MS-DOS basierten Softwareprogramm randomisiert. Entsprechend der zufälligen Verteilung der Versuchsgruppen wurde der zeitliche Ablauf ausgerichtet.

3.5 Versuchsablauf

Die Probengewinnungen und die Messungen erfolgten sowohl für die Kontroll- als auch die Behandlungsgruppen zu den angegebenen Zeitpunkten basal, nach IP, sofort nach Ischämie, 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h nach Ischämie.

Bis zum Messzeitpunkt „2 h nach Reperfusion“ wurden Messung und Entnahme der Gewebeproben in derselben Narkose durchgeführt (Finalversuche). Bei den Messzeitpunkten „24 h, 48 h und 96 h nach Reperfusion“ wurden die Tiere erneut wie oben angegeben narkotisiert, zunächst noninvasiv die O2C-Parameter gemessen und anschließend Blut und Gewebe entnommen (Abb. 5 und 6). Danach erfolgte in tiefer Narkose die Euthanasie der Tiere.

Das non-invasive Monitoring von Hämoglobin-Oxygenierung und -Konzentration sowie der kapillären Blutflussparameter Flow und Velocity mit dem O2C wurde simultan zu den jeweiligen Zeitpunkten bis zur Tötung der Tiere durchgeführt.

Alle Eingriffe an den Versuchstieren fanden in Narkose mit Hilfe einer intraperitonealen Ketanest-Rompun-Anästhesie statt. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Applikation von einer gewichtsadaptierten Menge von 10%igem Ketamin und 2%igem Xylazin mit NaCl (Mischverhältnis 0,4 ml Ketamin, 0,1 ml Xylazin, 1,0 ml NaCl) eingeleitet. Es war möglich die Narkose für mehrere Stunden tief genug fortzuführen, um die Induktion der Ischämie sowie die Messungen durchzuführen. Für die Tiere der Versuchszeitpunkte 6-8 entstand ein postoperatives Intervall von 24h, 48h und 96h. Sie wurden bis zur letzten Narkose einzeln gehalten. Um Schmerzzuständen vorzubeugen, wurde den Tieren, die aus der Narkose erwachen sollten, bei Beginn der Ligatur des Beines und kurz vor Erwachen aus der Narkose Temgesic (Buprenorphin) in einer dem Körpergewicht entsprechenden Dosis subkutan appliziert. Die Verabreichung des Schmerzmittels wurde bis zum Zeitpunkt der Euthanasie täglich einmal fortgeführt.

3.5.1 Durchführung der Messung mit dem O2C

Die Messsonde wurde ohne Druck auf die enthaarte Hautoberfläche gelegt. Nach einer kurzen Einstellungsphase mit konstanten Messwerten im Anzeigenbereich wurde die Messung für etwa 2 Minuten durchgeführt. Der Mittelwert der Messung wurde in das Protokoll übertragen.



Abb. 5 Messung von Hämoglobin-Oxygenierung und mikrovaskulärem Blutfluss bei der narkotisierten Maus mittels O2C.

3.5.2 Entnahme des Blutes und der Gewebeproben

Nach chemischer Entfernung der Haare mittels Pilca[®] med (Fa. H. Schwarzkopf GmbH, Hamburg) im Abdomenbereich und Bein wurde mit einer Ligatur ein Oberschenkel der Maus abgebunden. Diese Methode hatte sich als optimale pragmatische Lösung aus Vorversuchen ergeben, da durch eine isolierte Ligatur der Vasa femoralia aufgrund anatomischer Anastomosen (Corona mortis) keine komplette Ischämie erreicht werden konnte. Gemäß des

Untersuchungsprotokolles erfolgte die jeweils genau festgelegte IP mit entsprechend kurzzeitiger Reperfusion. Anschließend wurde eine vierstündige Ischämie induziert.

Die Entnahme der Blut- und Gewebeproben erfolgte zu dem im Protokoll vorgesehenen Zeitpunkt nach der letzten Messung mit dem O2C.

Hierzu erfolgte die Fixierung des Tieres auf dem Präparationstisch. Über einen Y-förmigen Schnitt wurde die Peritonealhöhle eröffnet. Unter Sicht mit dem Operationsmikroskop erfolgte mit mikochirurgischen Pinzetten die Präparation der Aorta und Vena cava caudalis. Nach vollständiger Freipräparation aus dem perivaskulären Gewebe erfolgte das Eingehen mit einer Kanüle in die Vena cava caudalis mit anschließender langsamer Aspiration des Blutes in eine mit etwa 0,1 ml Heparin benetzte Spritze. Die mögliche zu gewinnende Blutmenge lag üblicher Weise bei 1 ml. Anschließend erfolgte durch die Durchtrennung der Aorta die Euthanasie des Tieres in tiefer Narkose.

Das gewonnene Blut wurde in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und 10 Minuten zur Trennung der festen und flüssigen Blutbestandteile zentrifugiert .

Anschließend wurde das nun klar abgetrennte Serum abpipettiert und in einem gesonderten Eppendorf-Gefäß in einen Gefrierschrank mit -50°C gegeben.

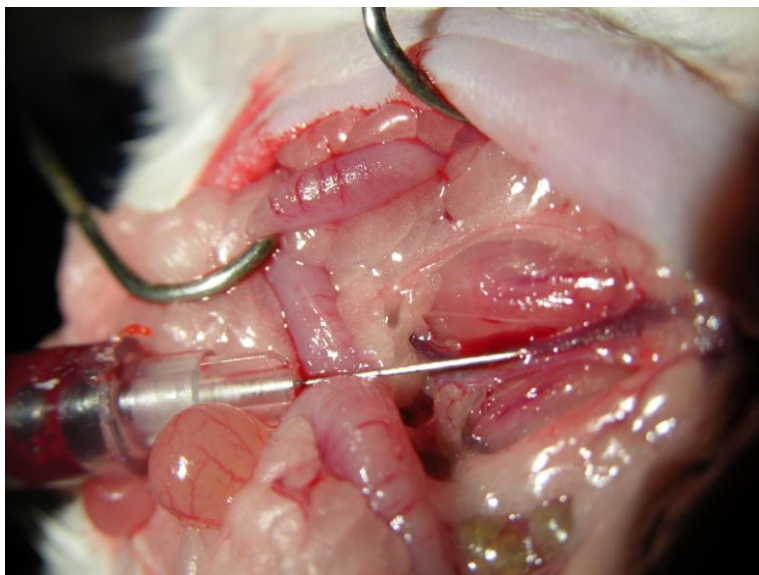


Abb. 6 Blutentnahme aus der V. cava caudalis, Blick durch das Operationsmikroskop.

Zeitgleich zur Zentrifugation erfolgte die Entnahme der Gewebeproben aus dem Hinterlauf der Maus. Hierzu wurde eine Präparation der Haut mit Pinzette und Skalpell bis auf die Muskulatur vorgenommen. Im Anschluss erfolgte die Entnahme eines etwa 1 x 1 cm großen Gewebestückes aus der Muskulatur distal der Ligatur, welches in ein Gefäß mit 4 %igem gepufferten Formalin (pH 6,8) zur Gewebefixierung gegeben wurde.

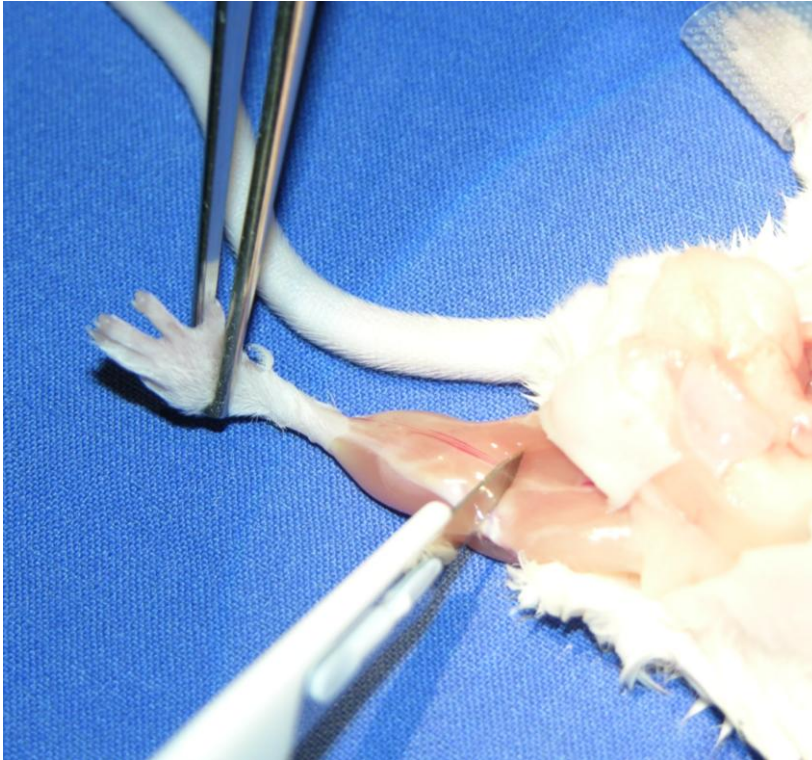


Abb. 7: Präparation von Muskelgewebe.

Die weitere vor Begutachtung erforderliche Aufarbeitung des Gewebes wurde durch die Pathologie nach Standardverfahren mit Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe sowie Formalinentfernung und Paraffineinbettung vorgenommen (siehe Kapitel 3.8).

3.5.3 Versuchsprotokolle

Alle während eines Versuchs ermittelten Messdaten mit dem O2C, sowie Informationen über Zeitpunkt der Narkose, Zeitpunkt der Blut- und

Gewebeentnahme und mögliche Besonderheiten während der Durchführung wurden in ein Versuchsprotokoll übernommen (siehe Anhang). Zur geordneten Übersicht und Zuordnung des Probenmaterials zu dem verwendeten Tier wurde eine Tier- und Versuchsnummer vergeben.

3.6 O2C-Messungen

Sämtliche Messungen wurden mit dem O2C (oxygen to see)-Gerät der Firma LEA Medizintechnik (Gießen) durchgeführt. Dieses optische Diagnosegerät dient der transkutanen Erfassung von Durchblutungs- und Sauerstoffparametern. Es werden dabei zwei bereits etablierte methodische Verfahren kombiniert: Laser-Doppler-Spektroskopie und Gewebespektrometrie. Die Laser-Doppler-Spektroskopie wird verwendet um Durchblutungsparameter zu messen. Durch die Gewebespektrometrie werden Hämoglobinoxygenierung und relative Hämoglobinkonzentration bestimmt.

3.6.1 Laser-Doppler-Spektroskopie

Die Laser-Doppler-Spektroskopie beruht auf dem Doppler-Prinzip, wobei Licht, welches an bewegten korpuskulären Strukturen (in diesem Fall Erythrozyten) reflektiert wird, einer Frequenzverschiebung unterliegt. Diese und die Erythrozytenbewegung stehen dabei in einem linearen Zusammenhang. Als Lichtquelle wird ein Diodenlaser der Schutzklasse 3B verwendet, dessen maximale Leistung 30 mW nicht überschreitet. Die Wellenlänge des emittierten Laserlichts beträgt 820 nm. Bei fachgerechter Benutzung ist eine Gefährdung für Patient und Untersucher ausgeschlossen. Eine flache Glasfasersonde dient zum einen dazu, die Messstelle mit Laserlicht zu beleuchten, zum anderen registriert sie das vom Gewebe reflektierte Laserlicht.

Zur Analyse dieses Lichtes wird die heterodyne Lichtschwebungstechnik angewendet. Bei dieser Methode wird reflektiertes, nichtfrequenzverschobenes Licht mit dem reflektierten, frequenzverschobenen Licht überlagert, und die entstehenden Schwebungsfrequenzen werden frequenzanalysiert. Die

berechnete Frequenzverschiebung wird vom O2C zum Anzeigeparameter der Blutflussgeschwindigkeit (Velocity) ausgewertet. Das reflektierte Licht wird sowohl durch die Erythrozytenbewegung als auch durch die Anzahl der Erythrozyten beeinflusst. Mit steigender Erythrozytenanzahl in den Kapillaren, Arteriolen und Venolen nimmt die Intensität des reflektierten Lichts zu. Die Erythrozytenanzahl wird zusammen mit der Blutflussgeschwindigkeit zum Anzeigeparameter Blutfluss (Flow) verrechnet. Durch eine spezielle geometrische Anordnung der Dioden gelingt es, das reflektierte Licht einer bestimmten Gewebetiefe zuzuordnen und so einen tiefenselektiven Eindruck über die Durchblutungssituation im Gewebe zu erhalten. Die Messparameter Blutfluss und Blutflussgeschwindigkeit werden simultan für eine Tiefe von 2 mm und 8 mm angegeben. Dadurch gelingt es, einerseits die oberflächliche Hautdurchblutung, andererseits die muskuläre Durchblutung zu beurteilen.

3.6.2 Gewebespektrometrie

Simultan zur Laser-Doppler-Spektroskopie werden die Hämoglobinoxygenierung und die relative Hämoglobinkonzentration mittels Gewebespektrometrie ermittelt. Die bereits im Rahmen der Laser-Doppler-Spektroskopie beschriebene Glasfasersonde übernimmt auch bei der Gewebespektrometrie zwei Funktionen. Zum einen beleuchtet sie das Gewebe, zum anderen registriert sie das reflektierte Licht. Die Photodetektion der Sonde umfasst das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts (500-630 nm Wellenlänge). Die Fasern zur Beleuchtung und zur Photodetektion haben jeweils einen Durchmesser von 400 µm und sind mit einem Abstand von 2 mm in der Sonde angeordnet. Durch Variation des Abstandes ist eine Änderung der Messtiefe möglich. Die Grundeinstellung liegt bei 2-4 mm. Das Licht (Weißlicht einer Halogenlampe mit 21 W) wird nach dem Eindringen ins Gewebe zu unterschiedlichen Teilen reflektiert, gestreut oder absorbiert. Das stärkste Absorbens ist dabei das Hämoglobin, dessen Absorptionseigenschaften entscheidend von seiner Oxygenierung abhängen. Der nicht absorbierte Teil des Lichts wird durch das Hämoglobin spektral verändert und nimmt die Farbe des Blutes an. In der Sonde werden die veränderten Spektren registriert, um

dann mit den bekannten Spektren von voll oxygeniertem Hämoglobin (zwei Absorptionsmaxima: 542 nm und 577 nm) und desoxygeniertem Hämoglobin (Absorptionsmaximum: 556 nm) verglichen zu werden (Abb. 8).

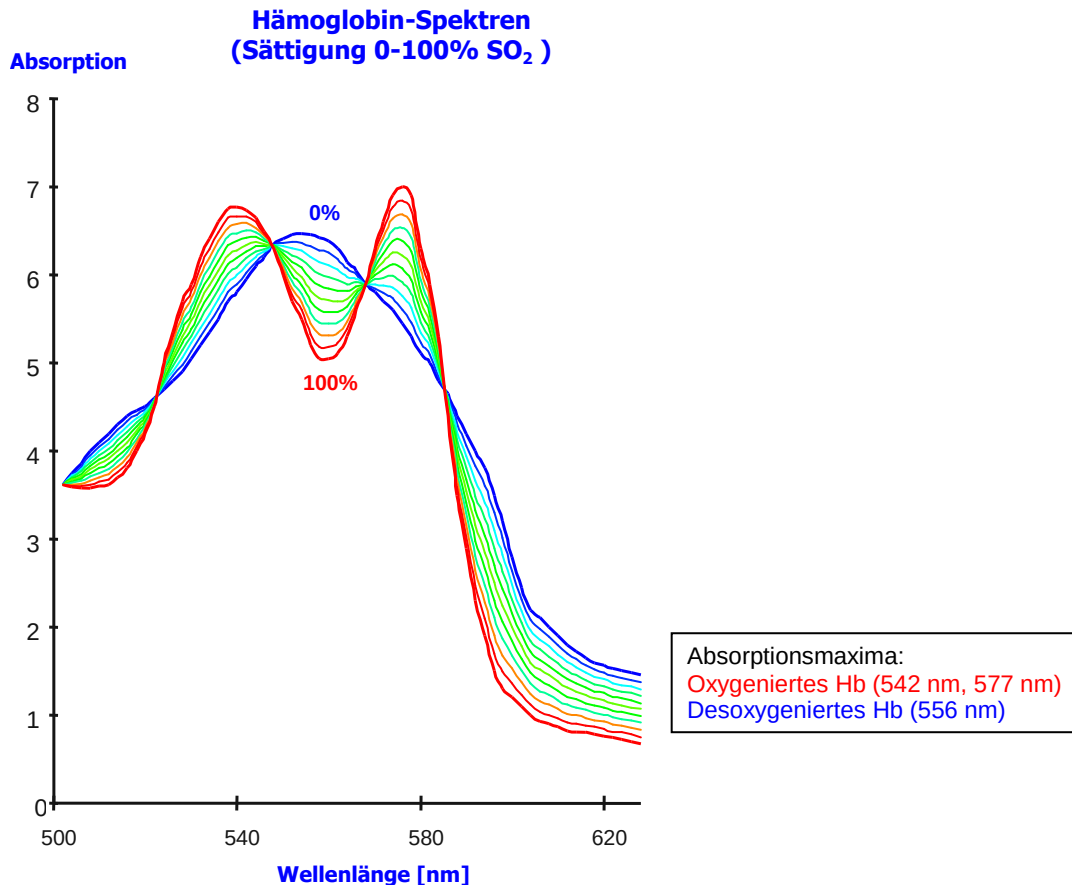


Abb. 8 Absorptionseigenschaft des Hämoglobins in Abhängigkeit vom Oxygenierungsgrad. Voll oxygeniertes Hämoglobin weist zwei Absorptionsmaxima bei 542 nm und 577 nm auf (rote Linie), desoxygeniertes Hämoglobin ein Maximum bei 556 nm (blaue Linie).

Der auf diese Weise ermittelte Wert gibt die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins in den Kapillaren, Arteriolen und Venolen an. Gefäße mit einem größeren Durchmesser als 100 µm absorbieren das Licht vollständig. 85 % des Hämoglobins befinden sich im venösen Anteil des Blutes. Somit repräsentiert der ermittelte Sauerstoffsättigungswert vor allem den venösen Anteil bzw. das

postkapilläre System. Die relative Hämoglobinkonzentration stellt ein Maß für die Gesamtblutmenge im beleuchteten Gewebevolumen dar. Dieser Parameter erfasst alle Erythrozyten unabhängig davon, ob sie sich in Bewegung befinden oder nicht. Er errechnet sich aus der Summe der Hämoglobinabsorption aller Wellenlängen. Die Hämoglobinsättigung muss dabei mitberücksichtigt werden, da voll oxygeniertes Hämoglobin 15 % mehr Licht absorbiert als desoxygeniertes Hämoglobin.

3.6.3 Fehlerquellen

Um störende Einflüsse während des Messvorgangs zu minimieren und ein zuverlässiges Messergebnis zu erzielen, sind folgende Aspekte zu beachten:

- Jegliche Bewegungen seitens des Tieres oder Untersuchers, die zu einer Sondendislokation führen, sind zu vermeiden. Die zu untersuchende Körperstelle sollte entspannt gelagert werden. Bei der Anwendung ist die kurzzeitige Fixation der Sonde über einen Klebestreifen von Vorteil.
- Ein Einfluss äußerer Lichtquellen wie Neonröhren, OP-Leuchten oder Sonnenlicht ist durch Abschirmung der Messstelle zu reduzieren.
- Insbesondere die Blutflussparameter reagieren sensibel auf zu starken Druck bei der Sondenpositionierung - Messartefakte sind die Folge. Die Sonde sollte deshalb zwar mit Hautkontakt, aber ohne jeden Druck aufgelegt werden. Die Kontrolle des Auflagedruckes erfolgt über die Anzeige der Hämoglobinspektren am Monitor.

3.6.4 Darstellungsmodus des O2C-Programms und technische Daten

Das O2C-Programm fährt automatisch in den Darstellungsmodus, der in einer Bildschirmansicht einen vollständigen Überblick über sämtliche Messwerte ermöglicht (Abb. 9).



Abb. 9: Ansicht des 02C-Monitors mit Onlinepräsentation der Oxygenisierungswerte und Blutflussparameter.

Im mittleren oberen Bildschirm Drittel befindet sich das Minutenfenster. Es enthält die Mittelwerte der vier Messgrößen Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (blau), relative Hämoglobin-Konzentration (rot) sowie Blutfluss (grün) und Blutflussgeschwindigkeit (gelb) in je zwei Gewebetiefen im zeitlichen Verlauf. Die Zeitachse kann variiert werden (2, 10, 20 oder 60 Minuten). Die sechs Zahlenwerte am rechten Rand des Bildschirms geben jeweils die aktuellsten Messwerte der Messgrößen wieder. Das APS-Anzeigefenster stellt das Histogramm der Geschwindigkeitsverteilung der Erythrozyten für jeden Laser-Doppler-Messkanal dar. Auf der x-Achse sind die Doppler-Shift-Frequenzen aufgetragen, die der Geschwindigkeit der Erythrozyten entsprechen. Auf der y-Achse wird die Häufigkeit aufgetragen (log. Darstellung) von Erythrozyten, die sich mit einer bestimmten Geschwindigkeit bewegen. Das darunter liegende rawSPEC-Anzeigefenster beinhaltet das Rohspektrum des detektierten Weißlichts. Das rechts benachbarte VIS-Anzeigefenster zeigt das korrigierte Hämoglobinspektrum an. Die vier als Sekundenfenster bezeichneten Anzeigefenster im mittleren und unteren Bildschirmbereich enthalten die ungemittelten Werte der Messgrößen im zeitlichen Verlauf. Im Flow- und

Velocity-Fenster (grün und gelb) kann die Pulsatilität des Blutflusses bewertet werden.

3.7 Zytokin-Messungen

Für die Bestimmung von Zytokinen und Endothelmarkern wurde jeder Maus zum entsprechenden Zeitpunkt 1 ml Blut aus der V. cava caudalis nach Präparation unter dem Mikroskop entnommen (Abb. 6) . Das entnommene Blut wurde aus der Spritze in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und 10 min zentrifugiert. Das zur Untersuchung notwendige Serum wurde abpipettiert, in ein weiteres Eppendorf-Gefäß gegeben und anschließend in einer Gefriereinheit mit einer Temperatur von -50 °C aufbewahrt.

Alle Proben wurden im Institut für chirurgische Forschung analysiert. Mittels Mouse Quantikine ELISA Kits der Firma R&D Systems GmbH aus Wiesbaden wurden das Zytokin KC (entspricht IL-8 beim Menschen) und der Endothelmarker sE-Selektin quantitativ bestimmt. Für das Monitoring hatten sich diese Parameter in den Vorversuchen mit gepoolten Seren als sehr gut erwiesen.

3.8 Histologische Untersuchungen

Die Gewinnung der Proben für die histologische Untersuchung erfolgte zum jeweiligen Versuchszeitpunkt im Anschluss an die Blutentnahme. Dabei wurden die Muskelproben, die sich im ischämischen Areal distal der Ligatur befanden, entnommen und in Formalin gelagert. Die weitere vor Begutachtung erforderliche Aufarbeitung des Gewebes wurde durch die Pathologie nach Standardverfahren mit Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe sowie Formalinentfernung und Paraffineinbettung vorgenommen.

Die Entwässerung des Gewebes erfolgte mit Hilfe des Autotechnikums in aufsteigender Alkoholreihe, wie folgt:

50 %iger Alkohol
 70 %iger Alkohol
 80 %iger Alkohol
 96 %iger Alkohol
 99 %iger Alkohol
 2 x n-Butylacetat
 3 x Paraffin bei 60°C (Medim Plast 58)

Anschließend wurden die Paraffinblöcke am Paraffinspender bei 60 °C gegossen (Tissue Tek II). Nach Abkühlung wurden 3 - 4 µm dünne Präparatschnitte angefertigt, welche im Anschluss in einem Wasserbad geglättet wurden und nachfolgend auf Präparatträger gezogen wurden (Engelbrecht 76 mm x 26 mm).

Anschließend wurden folgende Arbeitsschritte zur Färbung für die mikroskopische Begutachtung vorgenommen:

Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung:

- Entparaffinierung in Xylol
- Entfernung des Xylols in absteigender Alkoholreihe (99 %, 96 %, 70 % iger Alkohol)
- Spülen der Schnitte mit Aqua dest. zur Vorbereitung auf die Färbung
- Einlegen der Schnitte in Hämalun nach Mayer (Lösung aus 1000 ml Aqua dest., 2 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure-1-Hydrat)
- Bläuen unter fließendem Wasser
- Färbung mit Eosin (Stammlösung aus 10 g Eosin in 1000 ml 70 %iger Alkohol; Gebrauchslösung aus 10 ml Stammlösung , 90 ml Aqua dest., 3 Tropfen Essigsäure
- Spülen der Schnitte mit 70 %igem Alkohol

- Spülen der Schnitte mit 96 %igem Alkohol
- Spülen der Schnitte mit 99 %igem Alkohol
- Einlegen in 99 %igen Alkohol für 5 min
- Einlegen der Schnitte in Xylol für 5 min
- Eindecken der Präparate mit Eukitt

Nach erfolgter Färbung wurde die Begutachtung durch einen Pathologen des Institutes für Pathologie der Ruhr-Universität-Bochum vorgenommen. Hierbei erfolgte die Einteilung des histomorphologischen Gewebeschadens nach einem eigens dafür entwickelten Score, der zunächst in Vorversuchen konzipiert wurde und sich insbesondere am Auftreten von Muskelnekrosen orientiert.

Score- Einteilung

Grad 0

- keine Schädigungen

Grad 1

- 1-24 % des Gewebes ist nekrotisch
 - umschriebene Auflösung der Querstreifung
 - Muskelschwellung
 - beginnender Kernverlust

Grad 2

- 25-49 % des Gewebes ist nekrotisch
 - partieller Verlust der Querstreifung
 - Veränderungen der Muskelschläuche

Grad 3

- 50-74 % des Gewebes ist nekrotisch
 - zusätzlich zu dem bei Grad 2 genannten Schädigungsmuster vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten

Grad 4

- >75 % des Gewebes ist nekrotisch
 - Muskelnekrosen und Demarkierung der Nekrosen durch neutrophile Granulozyten, die ubiquitär infiltrieren

3.9 Statistische Methoden

Zur Verarbeitung der Messdaten im Rahmen der statistischen Analyse dienten die Programme Excel (Microsoft Office XP, 2002) und SPSS (Version 11.5). Die statistische Planung und Auswertung dieser tierexperimentellen Untersuchung erfolgte mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie. Für die statistische Ergebnisauswertung standen 28 Gruppen mit jeweils 10 NMRI-Mäusen zur Verfügung ($n = 280$). Hauptaufgabe war es, zu klären, ob sich die Zielparameter der Gruppen mit unterschiedlichen Ischämie- Reperusionsprotokollen zum jeweiligen Messzeitpunkt voneinander bzw. von den entsprechenden Kontrollgruppen ohne IP unterscheiden.

Zur Untersuchung der Gruppen auf den Zielparameter Muskelschaden (280 Messwerte) wurde zunächst zur Aufdeckung der Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen eine Varianzanalyse durchgeführt. Anschließend konnten diese Unterschiede im Paarvergleich mit dem Tukey-Test auf eine vorhandene Signifikanz überprüft werden.

Bei der Auswertung der Zielparameter Zytokine (280 Messwerte) und Endothelmarker (280 Messwerte) sowie der O₂C-Durchblutungsparameter Hämoglobin-Konzentration, Hämoglobin-Oxygenierung, Blutfluss und Blutflussgeschwindigkeit (50.400 Messwerte) mussten Ausreißer einkalkuliert werden. Um diese zu neutralisieren und Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen aufzudecken fand zunächst der Kruskal-Wallis-Test Anwendung. Die vorgefundenen Unterschiede wurden im Anschluss zum Paarvergleich dem Mann-Whitney-Test unterzogen.

In allen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 O2C-Messungen

Das non-invasive Monitoring ergab bei der kapillären Hämoglobinoxygenierung und den Blutfluss-Parametern in den drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung (IP) zunächst einen moderaten, nicht signifikanten Anstieg im Sinne einer ischämischen Hyperämie. Nach der vierstündigen Ischämie bei allen vier Versuchsgruppen blieb eine prompte ischämische Hyperämie bei den Flow-Werten aus. Die Hämoglobinoxygenierung wies im Vergleich zu den Basalwerten nach der vierstündigen Ischämie höhere Werte auf. Diese lagen allerdings niedriger als zum Messzeitpunkt nach der IP. Der Messverlauf der Hämoglobinoxygenierung ist in Abbildung 10, die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Messverläufe von oberflächlicher und tiefer Velocity sowie von oberflächlichem und tiefem Flow unterscheiden sich in ihrem grundsätzlichen Verlauf und statistisch nicht. Repräsentativ sind in Abbildung 11 der Messverlauf und in Tabelle 2 die Mittelwerte und Standardabweichungen des tiefen Flows dargestellt.

Die Hämoglobinkonzentration wies bei allen vier Versuchsgruppen und allen acht Messzeitpunkten mit einer maximalen Abweichung vom Basalwert von 10 % den konstantesten Verlauf auf. Eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Basalwerten wiesen die Hämoglobinoxygenierung und die Blutflussparameter bei der Kontrolle (nur vier Stunden Ischämie, keine IP) für die Messzeitpunkte 0,5 h und 2 h nach Ischämie auf. Bei den Gruppen mit IP kam es ebenfalls zu einer Reduktion dieser Parameter, jedoch ohne Signifikanz (Abb. 10 und 11, Tab. 1 und 2).

Bei den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 96 h nach Ischämie näherten sich die Messwerte wiederum den Basalwerten an. Diese Werte für die kapilläre Durchblutung lagen bei der Kontrolle konstant unterhalb der Messwerte der Gruppen, bei denen eine IP erfolgt war. Tendenziell wies die IP-Gruppe mit einer 10 minütigen Ischämie und 10 minütiger Reperfusion die günstigsten Durchblutungswerte auf. Eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den IP-Protokollen 5/5 und 2 x 5/5 konnte nicht ermittelt werden.

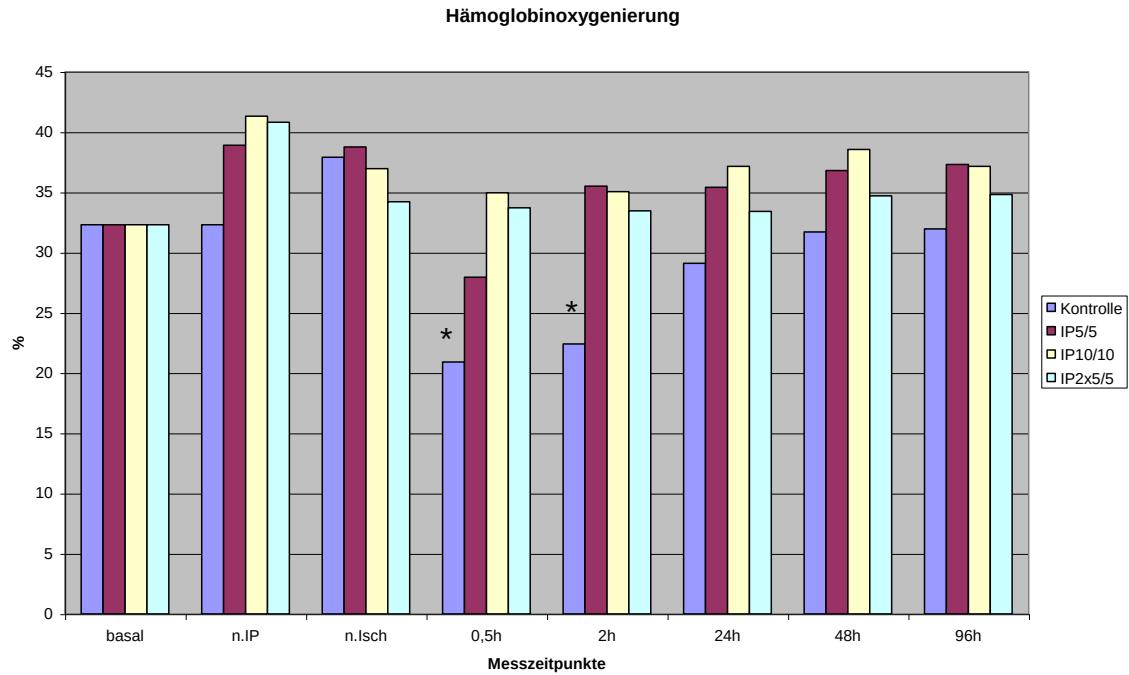


Abb. 10 Messverlauf der Hämoglobinoxygenierung der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280, Mittelwerte). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * p < 0,05, Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 h und 2 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Hb-Ox MW ± SD	Kontrolle	IP 5/5	IP 10/10	IP 2 x 5/5
basal	32,3 ± 6,36	32,3 ± 6,36	32,3 ± 6,36	32,3 ± 6,36
n. IP	32,3 ± 6,36	38,9 ± 8,21	41,3 ± 12,73	40,8 ± 11,32
n. Isch.	37,9 ± 7,07	38,75 ± 12,02	36,95 ± 4,02	34,2 ± 6,24
0,5 h	20,9 ± 3,91	27,95 ± 9,19	34,95 ± 4,95	33,7 ± 5,01
2 h	22,4 ± 4,12	35,5 ± 7,12	35,05 ± 11,67	33,45 ± 4,24
24 h	29,1 ± 5,12	35,4 ± 9,44	37,15 ± 6,97	33,4 ± 7,78
48 h	31,7 ± 5,82	36,8 ± 10,25	38,55 ± 7,07	34,7 ± 7,1
96 h	31,95 ± 8,23	37,3 ± 9,12	37,15 ± 10,06	34,8 ± 10,25

Tab. 1 Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Hämoglobinoxygenierung (Hb-Ox) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

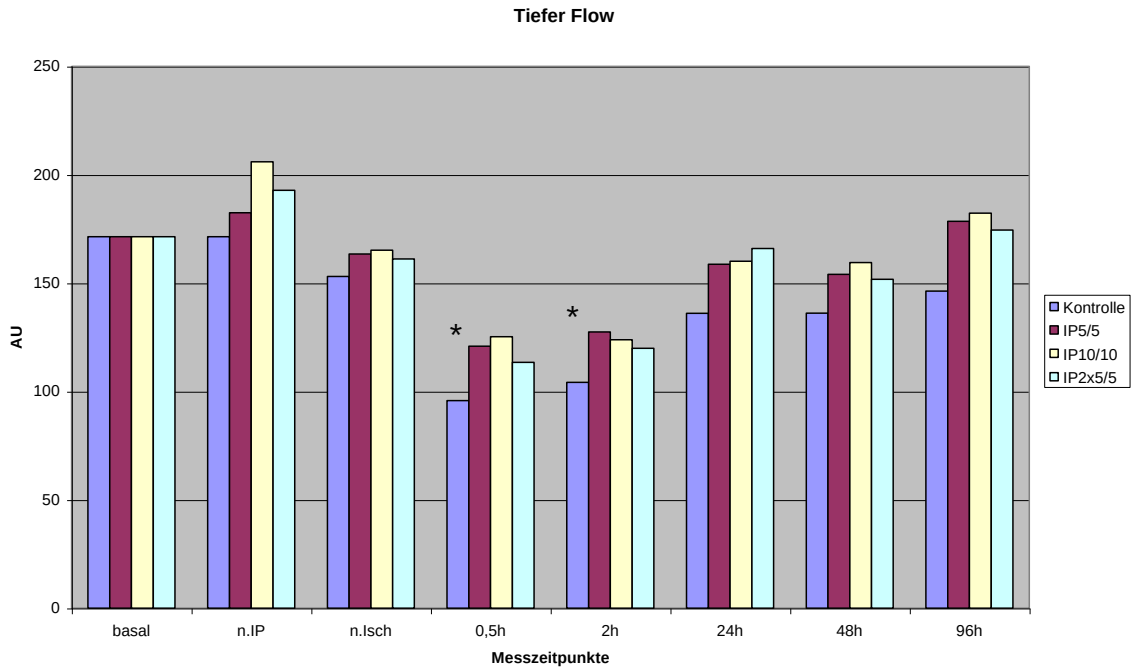


Abb. 11 Messverlauf des tiefen Flows der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280, Mittelwerte). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * p < 0,05, Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 und 2 h, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Tiefer Flow MW ± SD	Kontrolle	IP 5/5	IP 10/10	IP 2 x 5/5
basal	171,4 ± 35,70	171,4 ± 35,70	171,4 ± 35,70	171,4 ± 35,70
n. IP	171,4 ± 35,70	182,45 ± 29,41	206 ± 12,02	192,85 ± 21,22
n. Isch.	153,05 ± 24,74	163,45 ± 22,27	165,15 ± 17,63	161,1 ± 13,15
0,5 h	95,8 ± 34,35	120,85 ± 24,90	125,3 ± 16,69	113,4 ± 16,67
2 h	104,25 ± 21,21	127,45 ± 16,97	123,85 ± 21,21	119,9 ± 17,32
24 h	136,05 ± 25,46	158,65 ± 19,80	160,1 ± 30,65	166 ± 29,75
48 h	136,1 ± 33,74	154,05 ± 32,07	159,45 ± 41,27	151,75 ± 42,42
96 h	146,3 ± 12,02	178,55 ± 36,06	182,3 ± 17,68	174,5 ± 26,32

Tab. 2 Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des tiefen Flows der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

4.2 Zytokin-Messungen

Die Serumwerte des unspezifischen Entzündungsparameters KC, der beim Menschen Interleukin 8 entspricht und ein von Leukozyten gebildetes Initialsignal darstellt, wiesen bis zur Messung nach der vierstündigen Ischämie lediglich eine Schwankungsbreite von maximal 12 % auf (Abb. 12, Tab. 3). Erst während der Reperfusion stiegen die Werte bei der Kontrollgruppe ohne IP deutlich an, um beim Messzeitpunkt 2 h nach Ischämie mit 1366,2 pg/ml ihr Maximum zu erreichen. Im Vergleich zu den Basalwerten waren die Werte der Kontrollgruppen bei den Messzeitpunkten 0,5 h und 2 h nach Ischämie signifikant erhöht. Im weiteren Verlauf fielen die Werte kontinuierlich ab, um schließlich 96 h nach der Ischämie ihr Minimum mit 774,4 pg/ml zu erreichen.

Der kurvenförmige Verlauf der Gruppen mit IP glich bezogen auf die Messzeitpunkte grundsätzlich dem der jeweiligen Kontrollgruppen, wobei die Freisetzung des Entzündungsparameters KC bei den IP-Gruppen konstant niedriger lag. Mit dem konstanten Abfall von KC bei der Kontrollgruppe nach seinem Peak bei 2h nach Ischämie näherte er sich kontinuierlich bis zur letzten Messung 96 h nach Ischämie den Werten der IP-Gruppen an. Eine signifikante Differenz zwischen IP- und Kontrollgruppen konnte in der frühen Phase bei 0,5h nach der Ischämie gemessen werden. Die Werte bei der IP-Gruppe 10/10 waren regelmäßig am niedrigsten.

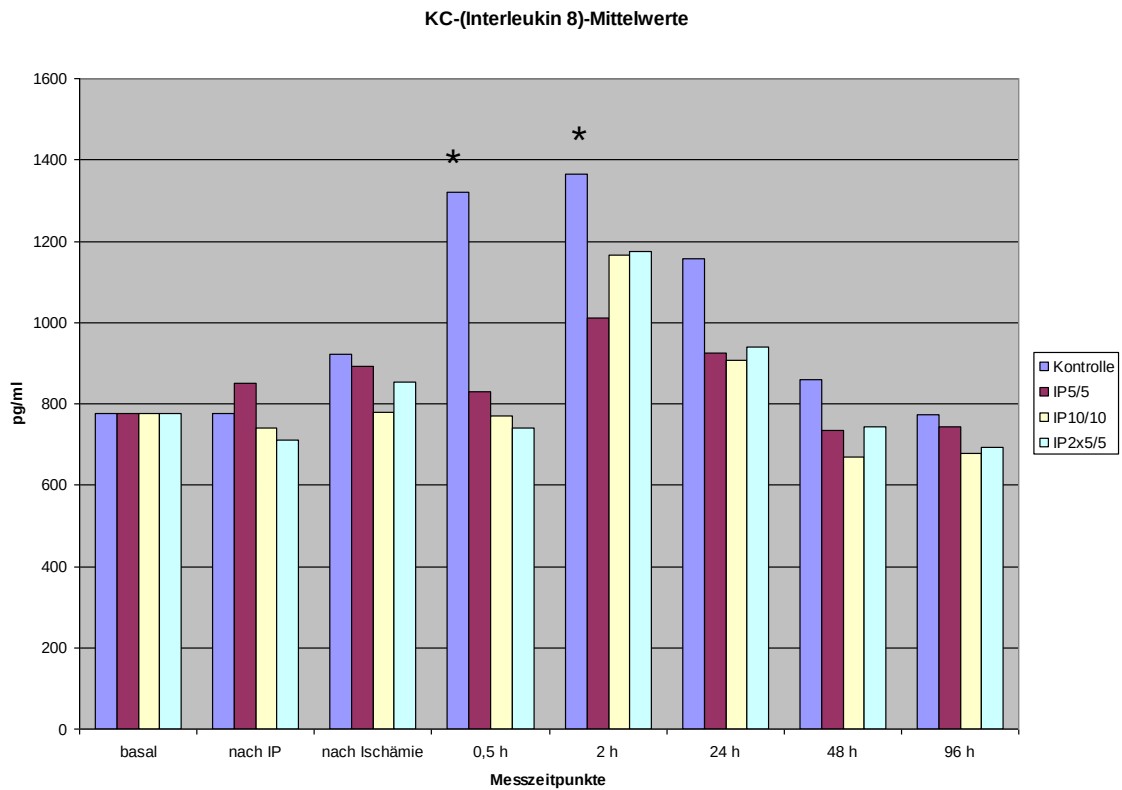


Abb. 12 Messverlauf von KC (Interleukin 8) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280, Mittelwerte). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * p < 0,05 Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 h und 2 h sowie zu den IP-Gruppen bei 0,5 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

KC-IL 8 MW $\pm$ SD	Kontrolle	IP 5/5	IP 10/10	IP 2 x 5/5
basal	776 $\pm$ 436,9	776 $\pm$ 436,9	776 $\pm$ 436,9	776 $\pm$ 436,9
n. IP	776 $\pm$ 436,9	850 $\pm$ 248,2	740,8 $\pm$ 240,4	711,8 $\pm$ 256
n. Isch.	922 $\pm$ 339,4	891 $\pm$ 441,1	778,8 $\pm$ 350,4	853 $\pm$ 135,8
0,5 h	1320,6 $\pm$ 94,8	830,6 $\pm$ 301,3	770,4 $\pm$ 393,4	740,6 $\pm$ 69,3
2 h	1366,2 $\pm$ 39,6	1012,4 $\pm$ 607,1	1166,8 $\pm$ 408,7	1175,2 $\pm$ 417,8
24 h	1155,8 $\pm$ 657,6	923,8 $\pm$ 507,1	908,4 $\pm$ 307,1	940,8 $\pm$ 111,7
48 h	859,8 $\pm$ 131,5	735,4 $\pm$ 263	669,6 $\pm$ 306,9	744,6 $\pm$ 121,6
96 h	774,4 $\pm$ 59,4	743,4 $\pm$ 171,2	677,2 $\pm$ 289,9	692 $\pm$ 147,1

Tab. 3 Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von KC (Interleukin 8) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

Die Serumkonzentrationen des Endothelmarkers sE-Selektins weisen ebenfalls wie die des KC einen kurvenähnlichen Verlauf auf (Abb. 13, Tab. 4).

Die Werte sowohl der IP- als auch der Kontrollgruppen nahmen nach der vierstündigen Ischämie im Vergleich zu KC bis zum zeitversetzten Maximum nach 24 h kontinuierlich zu, um bei den Messzeitpunkten 48 h und 96 h nach Ischämie wieder kontinuierlich abzufallen. Die Erhöhung von sE-Selektin war im Vergleich zu den Basalwerten bei 2 h und 48 h nur bei der Kontrolle signifikant erhöht, beim Messzeitpunkt 24 h nach Ischämie sind die Werte aller vier Gruppen im Vergleich zu den Basalwerten erhöht. Bei der letzten Messung 96 h nach Ischämie lagen die Werte aller vier Gruppen signifikant unterhalb der Basalwerte.

Insgesamt verlief die sE-Selektin-Konzentration, das heißt der Marker für einen Endothelschaden, bei der nicht präkonditionierten Kontrollgruppe konstant höher als bei den drei Gruppen mit IP. Beim Messzeitpunkt 48 h nach Ischämie war die Konzentration von sE-Selektin in der IP-Gruppe 10/10 sogar signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

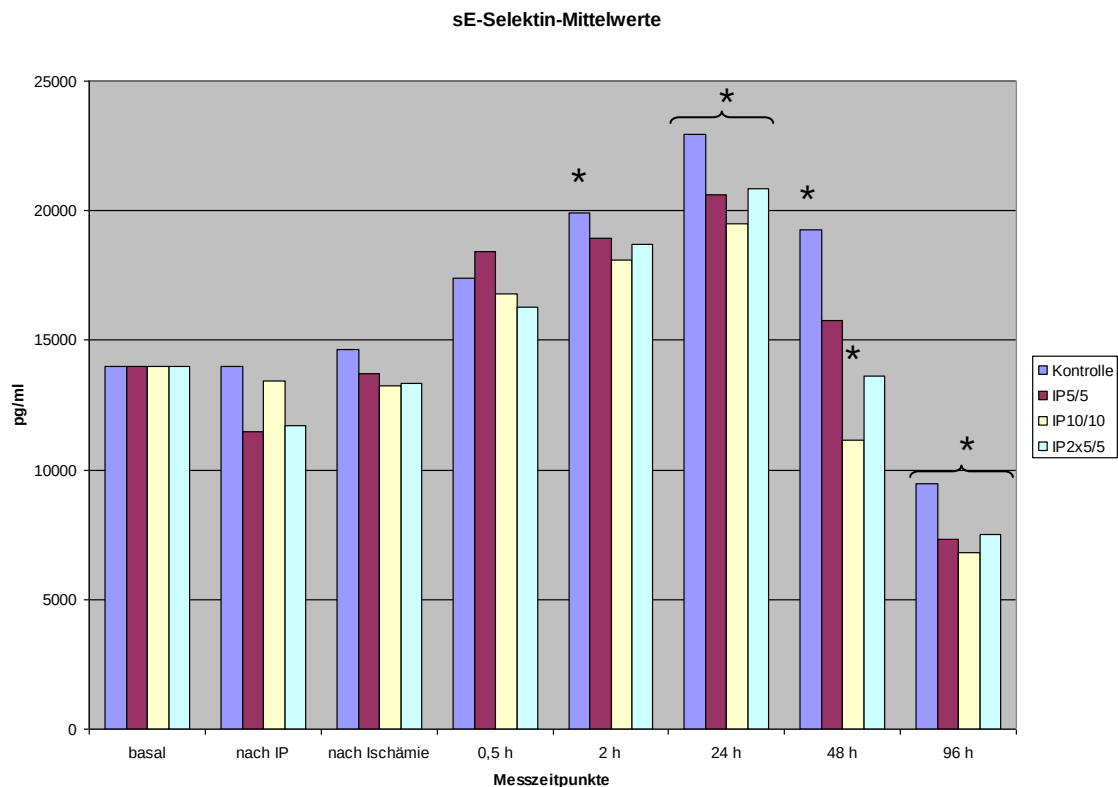


Abb. 13 Messverlauf von sE-Selektin der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280, Mittelwerte). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * p < 0,05 Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 2 h und 48 h, Kontrolle und IP-Gruppen zum Basalwert bei 24 h und 96 h, IP-10/10 zur Kontrolle bei 48 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

sE-Selektin MW $\pm$ SD	Kontrolle	IP 5/5	IP 10/10	IP 2 x 5/5
basal	13990 $\pm$ 4081	13990 $\pm$ 4081	13990 $\pm$ 4081	13990 $\pm$ 4081
n. IP	13990 $\pm$ 4081	11470 $\pm$ 1047	13410 $\pm$ 1161	11710 $\pm$ 1202
n. Isch.	14630 $\pm$ 2546	13690 $\pm$ 1884	13225 $\pm$ 1273	13340 $\pm$ 1156
0,5 h	17415 $\pm$ 4879	18410 $\pm$ 1414	16805 $\pm$ 3712	16280 $\pm$ 1431
2 h	19910 $\pm$ 2137	18925 $\pm$ 989	18080 $\pm$ 3584	18710 $\pm$ 3723
24 h	22970 $\pm$ 8874	20595 $\pm$ 3828	19505 $\pm$ 3217	20835 $\pm$ 6081
48 h	19250 $\pm$ 8733	15755 $\pm$ 4490	11155 $\pm$ 2061	13620 $\pm$ 2889
96 h	9460 $\pm$ 1556	7325 $\pm$ 1216	6790 $\pm$ 2349	7525 $\pm$ 1541

Tab. 4 Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von sE-Selektin der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

4.3 Histologische Untersuchungen

Der in Vorversuchen entwickelte Score, der sich insbesondere quantitativ an Myolysen, Infiltration von Entzündungszellen und eintretenden Nekrosen in der Muskulatur orientiert, erwies sich bei der gewählten Ischämiezeit von vier Stunden als sehr sinnvoll. Bei der Befundung der Gewebeproben aller 280 NMRI-Mäuse konnte sein gesamtes Spektrum ausgeschöpft werden. In den Abbildungen 14 bis 17 sind die Scores 1 bis 4 dargestellt, in denen sich pathologische Veränderungen in progredienter Weise zeigen. Score 0 spiegelt dagegen physiologisch intaktes Gewebe wieder.

Score 4, das heißt der höchste Schädigungsgrad, trat in der Kontrollgruppe ohne IP und vierstündiger Ischämie bereits erstmals zum Zeitpunkt 24 h nach Ischämie auf. Dagegen lag die größte Schädigung in den Gruppen mit IP lediglich bei Score 3 und wurde erstmals 48 h nach Ischämie diagnostiziert. Zeitversetzt zu den Indikatoren Durchblutung (Kapitel 3.5.1) und Kommunikationsproteine der Immunregulation (Kapitel 3.5.2) ließ sich histologisch erst ab dem Messzeitpunkt 24 h nach Ischämie ein zunehmender

Gewebeschaden nachweisen. Abbildung 18 zeigt den durchschnittlichen Schädigungsgrad innerhalb der Kontrolle und der drei IP-Gruppen in Abhängigkeit von den Untersuchungszeitpunkten. Die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 5 dargestellt. Dabei wiesen die Gewebeproben aller drei ischämisch präkonditionierten Gruppen 48 h und 96 h nach Ischämie einen hoch signifikant ($p < 0,01$) geringeren Gewebeschaden auf als die Kontrolle ohne IP. Die IP-Gruppe 10/10 zeigte die besten Ergebnisse und wies einen geringeren durchschnittlichen Schädigungsgrad auf als die IP-Gruppe 5/5 und 2 x 5/5.

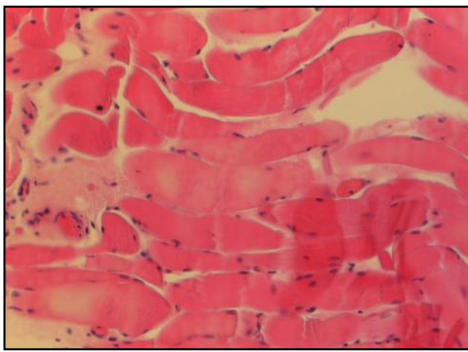


Abb.14: Score 1

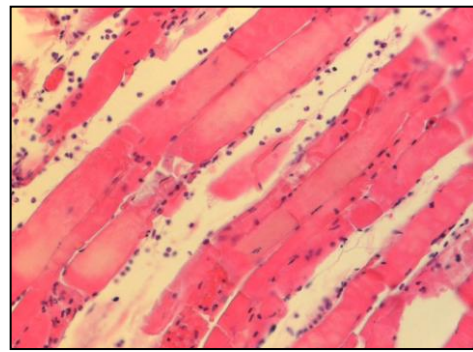


Abb.15: Score 2

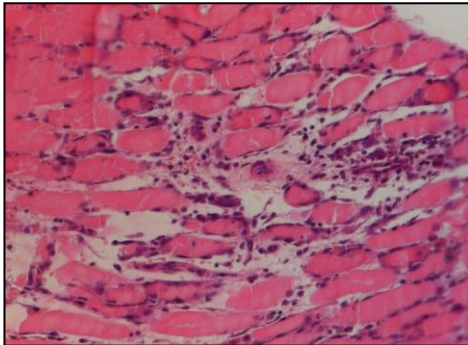


Abb.16: Score 3

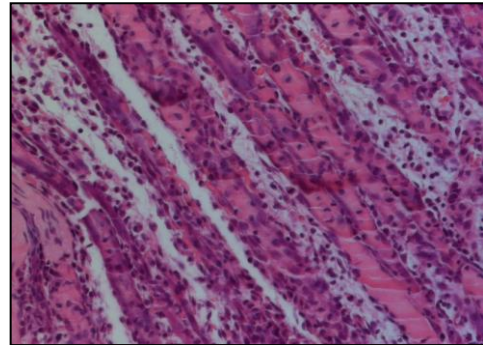


Abb.17 Score 4

Abb.14-17:

Postischämisches Gewebe mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden. Die Schnittbilder zeigen eine Zunahme der Schwellung einzelner Muskelfasern, beginnende Myolysen und Infiltration von Entzündungszellen mit

Muskelnekrosen (zur Quantifizierung siehe Score-Einteilung, Kapitel 3.3.5). HE-Färbung, Vergrößerung 200x.

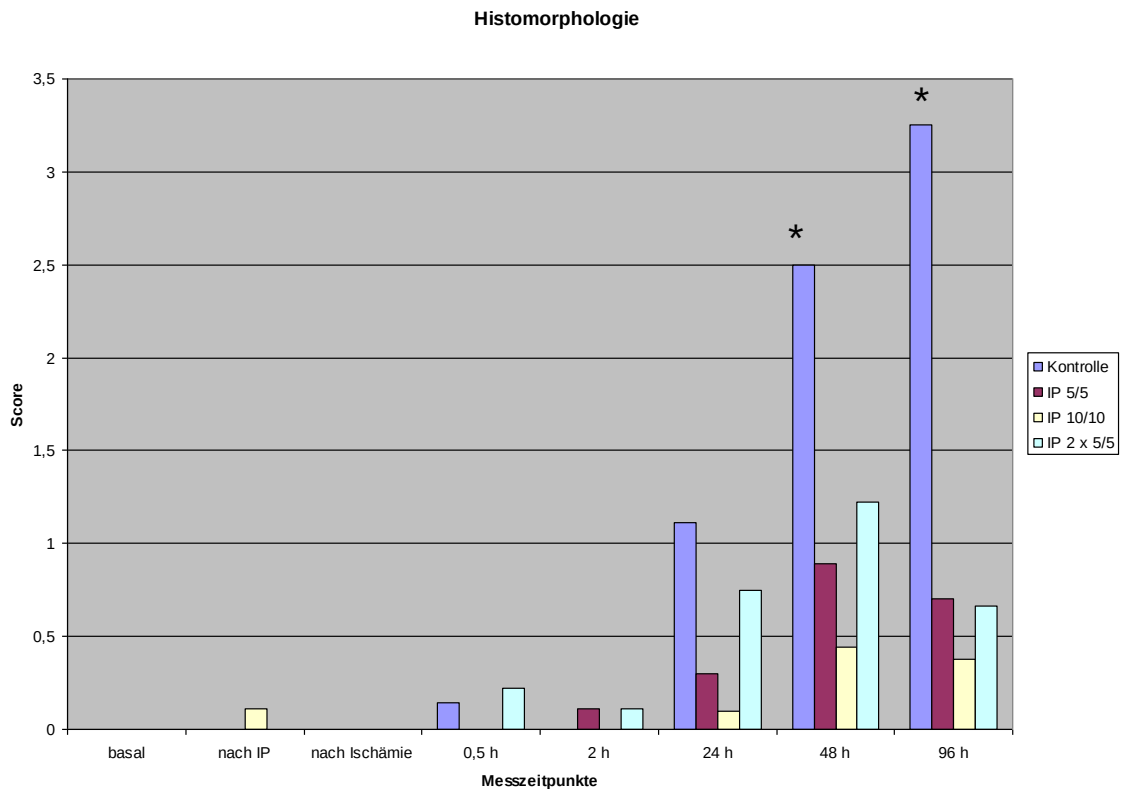


Abb.18 Histomorphologische Schädigungen der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle entsprechend der Score-Einteilung 0-4 (n = 280). Entnahmezeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Score basal an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * p < 0,05, Kontrolle im Vergleich zu den drei Gruppen mit IP bei 48 h und 96 h. Varianzanalyse und Tukey-Test.

Histol. MW $\pm$ SD	Kontrolle	IP 5/5	IP 10/10	IP 2 x 5/5
basal	0	0	0	0
n. IP	0	0	0,11 $\pm$ 0,32	0
n. Isch.	0	0	0	0
0,5 h	0,14 $\pm$ 0,42	0	0	0,22 $\pm$ 0,42
2 h	0	0,11 $\pm$ 0,32	0	0,11 $\pm$ 0,32
24 h	1,11 $\pm$ 1,29	0,3 $\pm$ 0,48	0,1 $\pm$ 0,32	0,75 $\pm$ 0,82
48 h	2,5 $\pm$ 0,85	0,89 $\pm$ 1,1	0,44 $\pm$ 0,52	1,22 $\pm$ 1,03
96 h	3,25 $\pm$ 1,03	0,6 $\pm$ 1,34	0,38 $\pm$ 0,52	0,67 $\pm$ 1,25

Tab. 5 Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der histomorphologischen Schädigungen der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle entsprechend der Score-Einteilung 0-4 (n = 280). Entnahmezeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Score basal an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

5 Diskussion

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IP) ist eine adaptive Antwort von Geweben auf kurze Ischämie- und Reperfusionsepisoden. Diese vermindert zum Teil drastisch Zellschäden während einer nachfolgenden langen Ischämie und Reperfusion. Auf dem Gebiet der Organtransplantation erreichte die IP in den letzten Jahren durch eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit von Grundlagenwissenschaftlern und Klinikern eine Weiterentwicklung bis hin zur klinischen Anwendung. Haupteinsatzgebiete sind dabei die Transplantation von Herz, Leber und Niere (BANGA et al., 2005, S.531; BORATYNSKA et al., 2004, S.9; FAWCETT et al., 2005, S.528).

Auch beim mikrochirurgischen Transfer von aus Haut, Fett, Muskel und/oder Knochen bestehenden Transplantaten erscheint die Aussicht, einen postischämischen Gewebeschaden zu minimieren, lohnenswert. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit über thermische Methoden die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP), die eine protektive Wirkung auf Ischämie-/Reperfusionsschäden ausüben, zu induzieren. Um eine signifikante Erhöhung dieser HSP zu erreichen, werden in der Regel Applikationszeiten der thermischen Reize von mindestens 30 Minuten angegeben (KOENIG et al., 1992, S.660; RUCKER et al., 2001, S.451; WANG et al., 1998, S.779). Dies erscheint für eine klinische Anwendung als zu kompliziert und zu lang.

Eine weitere Möglichkeit den postischämischen Gewebeschaden zu minimieren besteht in einer pharmakologischen Intervention. Dabei handelt es sich häufig um Medikamente, die zwar eine HSP-Induktion bewirken können, jedoch gleichzeitig ungewollte systemische Veränderungen hervorrufen und aufgrund von Wechselwirkungen bei Langzeiteingriffen ein zusätzliches Sicherheitsrisiko darstellen (BRAR et al., 2002, S.292; LU et al., 2002, S.194). Viele dieser Pharmaka beeinflussen die Durchblutungs- und Gerinnungseigenschaften, was beim mikrochirurgischen Gewebetransfer fatale Folgen haben kann (CONRAD und ADAMS, 2001, S.2088; PETER et al., 1997, S.1115; SHALOM und WESTREICH, 2001, S.117). In ihrer Übersichtsarbeit über Reperfusionsschäden folgern KHALIL et al (2006, S.1030), dass es aktuell kaum praktikable Studien gibt, die eine pharmakologische Intervention zur Verminderung des postischämischen Gewebeschadens nachweisen können.

Mittlerweile gibt es Studien über die Möglichkeit der Postkonditionierung zur Verminderung des postischämischen Gewebeschadens. MOON et al. (S 535) führten 2008 eine Studie an 43 Ratten durch, bei denen ein an der A. epigastrica gestielter Hautlappen nach einer vierstündigen Ischämie einer sogenannten Postkonditionierung zugeführt wurde, d.h. es wurde anschließend an die Ischämiezeit über 3 Minuten jeweils 6 Mal für 15 sec. eine Reocclusion und Reperfusion durchgeführt. Als Messparameter dienten die Beurteilung der Nekrosen des Lappens mit histologischer Aufarbeitung und Bestimmung der inflammatorischen Zellen im Gewebe sowie die Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase im Gewebe, einem Enzymmarker für die Akkumulation von Neutrophilen bei der Entstehung eines postischämischen Gewebeschadens. Bei den Ergebnissen zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Gruppe mit Postkonditionierung eine signifikante Verringerung der Nekrosen mit verminderter inflammatorischer Antwort und eine deutliche Verminderung der Aktivität der Myeloperoxidase. Trotz der signifikanten Ergebnisse stellt sich hier jedoch die Frage der Praktikabilität des Verfahrens der Postkonditionierung im klinischen Alltag. Nach dem Transfer des gehobenen Lappens und der langen Ischämiezeit erfolgt der Anschluss an die Empfängerregion und somit die Reperfusion. Anschließend daran eine erneute Manipulation im Bereich der anastomosierten Gefäße zu unternehmen um eine Postkonditionierung durchzuführen erscheint im klinischen Alltag sehr gewagt und risikoreich.

Aus diesen Gründen schien die Strategie der ischämischen Präkonditionierung für die klinische Anwendung im Fachgebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie das größte Potential zu haben und war deshalb Grundlage dieser experimentellen Untersuchungen. Wenige Autoren haben bei der tierexperimentellen Untersuchung des Einflusses der IP auf den postischämischen Gewebeschaden auch Durchblutungsparameter zum Gegenstand ihrer Messungen gemacht. ATTKISS et al. (1999, S.224) untersuchten den Effekt der IP am M. rectus femoris bei 16 Kaninchen. Der Versuchsaufbau sah drei Gruppen vor: Erstens 2 Stunden Ischämie, zweitens 3,5 Stunden Ischämie und drittens 3 Zyklen von IP mit 10 Minuten Ischämie gefolgt von jeweils 10 Minuten Reperfusion mit anschließend 3,5 Stunden Ischämie. Die Sauerstoffkonzentration im Gewebe war Zielparameter und wurde während der Ischämie und bis 6 Stunden nach Ende der Ischämie

gemessen. Die Sauerstoffkonzentration im M. rectus femoris war in Gruppe 2 mit einer Ischämie von 3,5 Stunden im Vergleich zu Gruppe 1 mit einer Ischämie von 2 Stunden zu den Messzeitpunkten 5, 10, 30, 60 und 360 Minuten nach Ende der Ischämie signifikant reduziert. Die Sauerstoffkonzentration im Muskel zeigte in Gruppe 3 mit IP 30 und 60 Minuten nach Ende der Ischämie eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu Gruppe 2 mit derselben Ischämiedauer aber ohne IP. Die Autoren folgerten, dass IP die Sauerstoffkonzentration im Muskelgewebe nach Reperfusion und vorheriger längerer Ischämie positiv beeinflusst, und die Messung der Sauerstoffkonzentration eine sensitive Methode zur Bestimmung der Gewebedurchblutung im reperfundierten Skelettmuskel darstellt (ATTKISS et al., 1999 S.227). Bei unseren Untersuchungen erfolgte neben der Bestimmung der Hämoglobinoxygenierung und -konzentration zusätzlich die Messung des kapillären Blutflusses und der Blutflussgeschwindigkeit. Bei einer vierstündigen Ischämie konnten hier 0,5 und 2 Stunden nach dem Ischämieereignis eine signifikant höhere kapilläre Hämoglobinoxygenierung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IP gemessen werden. Auch die kapillären Blutflussparameter wiesen zu den Messzeitpunkten 0,5, 2, 24, 48 und 96 Stunden nach der Ischämie in den drei Gruppen mit IP höhere Werte im Vergleich mit den Kontrollgruppen ohne IP auf.

Einen vergleichbaren protektiven Einfluss zeigte die IP auf den Verlauf von Zytokinen und löslichen Adhäsionsmolekülen. Im Vergleich zu den Basalwerten zu Beginn der Untersuchung waren die Werte der Kontrollgruppen bei den Messzeitpunkten 0,5 und 2 h nach Ischämie signifikant erhöht. Eine so massive Erhöhung dieser proinflammatorischen Botenstoffe konnte bei den IP-Gruppen 0,5 h nach Ischämie komplett und 2 h nach Ischämie weitgehend verhindert werden. Auch 24, 48 und 96 Stunden nach Ischämie lagen die Konzentrationen von KC, das dem humanen IL-8 entspricht, bei den IP-Gruppen konstant niedriger als bei den Kontrollen. Auch die Konzentrationen des löslichen sE-Selektins, als Marker für einen Endothelschaden, lagen bei den Kontrollgruppen ohne IP konstant höher als bei den drei Gruppen mit IP. Diesbezüglich wies die IP mit 10 Minuten Ischämie gefolgt von 10 Minuten Reperfusion die günstigsten Werte auf. Das Endothel wird von einem Schädigungsreiz - in diesem Falle der vierstündigen Ischämie - später getroffen als die Interleukin produzierenden

Leukozyten. Dies erklärt den zeitverzögerten Anstieg des sE-Selektins im Vergleich zum proinflammatorischen Frühphase-Zytokin KC bzw. IL-8. Unter IP kommt es zu einer systemischen Reduzierung der Freisetzung dieses Zytokins in der Frühphase der Reperfusion, d.h. die IP wirkt anti-inflammatorisch und verhindert dadurch die unerwünschte Leukozytenaktivierung mit „capillary plugging“ und einem „no reflow phänomen“. Um eine ausreichende Blutmenge für die Bestimmung von KC und sE-Selektin zu erhalten, erfolgte die Blutentnahme an der V. cava caudalis der Maus. Die Messwerte belegen deshalb eine systemische Verminderung der Zellaktivierung. Interessant wäre auch eine selektive Konzentrationsbestimmung in der V. femoralis der betroffenen Extremität nach der erfolgten Ischämie, beispielsweise im Vergleich zur kontralateralen Seite ohne Manipulation. Dies lässt sich allerdings bei der Tierspezies Maus aufgrund des eingeschränkten Blutvolumens nicht umsetzen.

Zahlreiche Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Zytokinen und löslichen Adhäsionsmolekülen mit einem Gewebeschaden, sei er durch einen elektiven chirurgischen Eingriff oder durch ein unfallbedingtes Trauma ausgelöst. Bei diesen Untersuchungen konnte eine direkte Korrelation dieser Kommunikationsproteine mit dem Ausmaß der Gewebeschädigung, die durch ein Ischämie-/Reperfusionseignis verursacht worden ist, festgestellt werden (HUDA et al., 2004, S. 501; SABLITZKI et al., 2003, S.75). Beide Gruppen dieser Mediatoren sind bei entsprechender Erhöhung eindeutig mit der Ausbildung eines Multiorganversagens assoziiert und lassen sich durch IP positiv beeinflussen.

Diese Mediatoren sind Initialsignale und kündigen einen entstehenden Gewebeschaden an. Zur Beurteilung des Gewebeschadens wurde in Vorversuchen eigens ein histologischer Score für eine vierstündige Ischämiezeit entwickelt. Ziel war es dabei, möglichst die ganze Breite des Schädigungsmusters qualitativ und quantitativ zu erfassen. Ein ähnlich systematisches Vorgehen wiesen die Studien von MARIAN et al. (2005, S. 525) auf, die die IP anhand eines Muskellappens bei einer weitaus geringeren Fallzahl von 30 Tieren untersuchten. Histologisch wurde allerdings nur Gewebe zum Messzeitpunkt 48 Stunden nach Ischämie ausgewertet. Weiterhin war nur ein IP-Protokoll von 3 x 10 Minuten Ischämie gefolgt von jeweils 10 Minuten

Reperfusion bei anschließend 4 bzw. 6 Stunden Ischämie Gegenstand dieser Untersuchung. MARIAN et al. (2005) konnten zeigen, dass mit IP im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich weniger Gewebenekrosen auftraten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen HARRALSON et al. (2005), welche die Auswirkungen der IP auf den M. latissimus dorsi-Lappen an Ratten untersuchten. Sie bewerteten Muskelproben bis zu 96 h nach einer vierstündigen Ischämie und fanden eine signifikante Protektion vor Nekrosen durch IP. Ihr IP-Protokoll bestand in 2 x 30 Minuten Ischämie gefolgt von jeweils 10 Minuten Reperfusion. Diese Arbeiten von MARIAN et al. (2005, S. 527) und HARRALSON et al. (2005, S. 219) belegen den Nutzen der IP unzweifelhaft. Aufgrund ihrer langen IP-Zeiten erscheint allerdings ein Transfer in den Operationssaal problematisch.

Bei 50 Tieren untersuchten ZAHIR et al. bereits 1998 (S. 431) die Bedeutung verschiedener Längen und Wiederholungen der IP-Zyklen an muskulokutanen M. rectus abdominis-Lappen. Eine Beurteilung des Lappengewebes erfolgte mittels computergesteuerter Videoplanimetrie. Auf eine histologische Auswertung wurde allerdings verzichtet. Untersucht wurden von diesen Autoren für einen klinischen Einsatz geeignetere IP-Protokolle: 5 Minuten Ischämie gefolgt von 5 Minuten Reperfusion, 2 x 5/5, 3 x 5/5, 10/10, 2 x 10/10 und 3 x 10/10 Ischämie/Reperfusion. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Protektion des postischämischen Lappengewebes sowohl mit der Länge als auch der Anzahl der Zyklen korreliert. Von Nachteil bei dieser Studie ist allerdings, dass bei diesen Transplantaten weder Durchblutungsparameter noch Gewebeschäden histologisch eruiert wurden. SAITA et al. (S. 244) untersuchten 2002 den histologischen Gewebeschaden an der Skelettmuskulatur an Ratten abhängig von verschiedenen Längen der IP-Zyklen. Hierbei zeigten 3-5 Zyklen von einer 10/10 IP vor einer vierstündigen Ischämie einen deutlich protektiven Effekt auf die Muskulatur. Als effektivstes IP-Protokoll zur Verminderung des postischämischen Gewebeschadens an einem Rattenmodell mit muskulocutanem Lappen beschrieben 2008 WANG et al. Zyklen von einer 10 minütigen Ischämie gefolgt von einer 5-minütigen Reperfusion über 2-3 Zyklen.

Kritische Stimmen wie in der Veröffentlichung von WANG (2008, S.37) äußern, dass die meisten Studien zur Ischämischen Präkonditionierung an gefäßgesunden Tieren durchgeführt wurden und daher kein direkter Transfer in

den klinischen Alltag erfolgen kann, da viele der dort operierten Patienten an vaskulären Vorerkrankungen leiden, wie z.B. Diabetes Mellitus. Einige Autoren wiesen einen negativen Effekt der IP an diabetischen Tieren nach (KRISTIANSEN et al., 2004, S.1719, HASSOUNA et al., 2006, S. 456). Es gibt allerdings auch Studien an diabetischen Tiermodellen, die einen Schutzeffekt der Präkonditionierung auf die endotheliale Funktion von diabetischen Koronararterien nachweisen (BOUCHARD und LAMONTAGNE, 1998, S.88). TATSUMI et al., (1998, S.713) beschrieben sogar, dass diabetisches Myokard vermehrt von einer Präkonditionierung profitiert verglichen mit einem gesunden Myokard.

Der Großteil der Studien untersuchte aufgrund der Durchführbarkeit einer Lappenhebung am Rattenmodell. TATLIDEDE et al. (2009, S.116) untersuchten 2009 den histologischen Gewebeschaden an einem an der A.thoracica gestielten Hautlappen mit und ohne IP von 20/20 und nachfolgender Ischämiezeit von 10 Stunden an allerdings nur 39 Mäusen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die mit der IP von 20/20 behandelten Hautlappen 7 Tage nach Ischämie 43 % weniger Nekrosen aufwiesen als die Kontrollgruppe.

Aus diesen Gründen erschien es notwendig, eine umfassende tierexperimentelle Studie zu entwickeln, die sowohl für den späteren klinischen Einsatz geeignete IP-Protokolle enthielt, als auch exakte Daten zur Durchblutung und dem histologischen Schädigungsmuster beinhaltete. Weiterhin erschien es sinnvoll, sowohl Früh-, als auch Spätschäden aufzudecken. Deshalb wählten wir insgesamt sechs Untersuchungszeitpunkte, die von unmittelbar nach bis hin zu 96 Stunden nach dem Ischämieereignis reichten. Zusätzlich wurde mit dem ausgewählten Transplantat „Hinterlauf der Maus“ erstmals ein osteomyokutaner Lappen Gegenstand einer IP-Studie, und somit die Auswirkung des Knochens als Schockorgan mit berücksichtigt.

Diese Untersuchung mit der in der Literatur bisher höchsten Fallzahl (n = 280) ergab ab einem Zeitpunkt von 48 h nach Ischämie signifikant geringere histologisch nachgewiesene Gewebeschäden für die IP-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne IP. Dabei wiesen die Mäuse mit dem IP-Protokoll 10/10 noch geringere Schäden des Gewebes auf verglichen mit den IP-Protokollen 5/5 und 2 x 5/5.

Mit den erhaltenen Ergebnissen war es somit möglich, die in Kapitel 2 formulierten Fragen eindeutig und umfassend zu beantworten.

Es gilt nun, wie in einigen Arbeiten bereits gefordert (KHALIL et al, 2006, S.1030, HARDER et al., 2007, S.508), die hier gewonnenen Ergebnisse in den klinischen Alltag im Rahmen von prospektiven, randomisierten klinischen Studien am Patienten zu transferieren. Am Transplantat könnten die Vitalparameter mittels O2C gemessen werden. Die inflammatorischen Marker könnten einmal lokal aus dem Lappenblut sowie auch systemisch aus dem Blutkreislauf bestimmt werden. Hierzu und vor allem auch für die Gewinnung von Gewebeproben wäre ein ethischer Antrag obligat. Insgesamt müsste allerdings berücksichtigt werden, dass wahrscheinlich verschiedene Transplantate verschiedene Reperfusionsschäden davontragen können. Zudem wird vermutlich eine einzige Abteilung zu geringe Patientenfälle aufweisen können um ausreichende Fallzahlen zu erreichen, so dass bestenfalls eine Multi-Center-Studie kreiert werden müsste.

6. Zusammenfassung

Bei der Verwendung mikrochirurgischer Transplantate bei der Defektdeckung kommt es regelmäßig zu postischämischen Gewebeschäden, die maßgeblich für die perioperative Morbidität mit Wundheilungsstörung bis hin zum Transplantatverlust verantwortlich sind. Ziel dieser Studie war es, durch Ischämische Präkonditionierung den postischämischen Gewebeschaden im Tiermodell zu vermindern.

In einem Tiermodell an 280 NMRI-Mäusen wurde der bei der Ischämie entstandene Gewebeschaden bis 96 h nach einem Ischämieereiz untersucht. Als Äquivalent zu einem osteomyokutanen Transplantat diente ein Hinterlauf des Tieres. In 3 Gruppen erfolgte eine unterschiedliche Ischämische Präkonditionierung und eine 4. Gruppe ohne Ischämische Präkonditionierung diente als Kontrolle. Anschließend wurde das Transplantat, d.h. hier der Hinterlauf der Maus einer vierstündigen Ischämie ausgesetzt.

Untersucht bzw. gemessen wurde an 7 verschiedenen Zeitpunkten bis zu 96 h nach Ischämie.

Der Gewebeschaden wurde an den Zielparametern Muskulatur, die histologisch aufgearbeitet und mikroskopisch bewertet wurde, einer quantitativen Bestimmung der Zytokine KC (entspricht IL-8 beim Menschen) und sE-Selektin im Serum, sowie der Gewebevitalität durch non-invasives Monitoring von Hämoglobin-Oxygenierung und des mikrovaskulären Blutflusses gemessen und bewertet.

Alle drei Gruppen mit Ischämischer Präkonditionierung wiesen nach dem Ischämieereignis signifikant geringere histologisch nachweisbare Gewebeschäden auf als die Kontrollgruppen. Auch die Durchblutungsparameter wurden durch Ischämische Präkonditionierung frühzeitig und positiv beeinflusst. Die Präkonditionierungsgruppe mit 10 Minuten Ischämie und anschließender 10 minütiger Reperfusion wies dabei die besten Ergebnisse auf.

7. Literaturverzeichnis

- Attkiss K.J., Suski M., Hunt T.K., Buncke H.J.:
Ischemic preconditioning of skeletal muscle improves tissue oxygenation during reperfusion.
J. Reconstr. Microsurg. 15 (1999), 223-228.
- Banga N.R., Homer-Vanniasinkam S., Graham A., Al-Mukhtar A., White S.A., Prasad K.R.:
Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver.
Br. J. Surg. 92 (2005), 528-538.
- Bill T.J., Hoard M.A., Gammper T.J.:
Applications of hyperbaric oxygen in otolaryngology head and neck surgery: facial cutaneous flaps.
Otolaryngol. Clin. North Am. 34 (2001), 753-766.
- Boratynska M., Kaminska D., Mazanowska O.:
Prevention and therapy of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation.
Postepy. Hig. Med. Dosw. 18 (2004), 9-17.
- Bouchard J.F., Lamontagne D.:
Protection afforded by preconditioning to the diabetic heart against ischaemic injury.
Cardiovasc. Res. 37 (1998), 82-90.
- Bowen C.V., Leach D.H., Crosby N.L., Reynolds R.:
Microvascular anastomoses. A comparative study of fibrinogen adhesive and interrupted suture techniques.
Plast. Reconstr. Surg. 97 (1996), 792-800.
- Brar B.K., Railson J., Stephanou A., Knight R.A., Latchman D.S.:
Urocortin increases the expression of heat shock protein 90 in rat cardiac myocytes in a MEK $\frac{1}{2}$ -dependent manner.
J. Endocrinol. 172 (2002), 283-293.
- Conrad M.H., Adams W.P. Jr.:
Pharmacologic optimization of microsurgery in the new millennium.
Plast. Reconstr. Surg. 108 (2001), 2088-2096.

- Disa J.J., Cordeiro P.G., Hidalgo D.A.:
Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 cases.
Plast. Reconstr. Surg. 104 (1999), 97-101.
- Drake D.B., Faulkner B.C., Amiss L.R.Jr., Spotnitz W.D., Morgan R.F.:
Thrombogenic effects of a nonthrombin-based fibrin sealant on microvenous anastomoses in a rat model.
Ann. Plast. Surg. 45 (2000), 520-524.
- Eckert P., Schnackerz K.:
Ischemic tolerance of human skeletal muscle.
Ann. Plast. Surg. 26 (1991), 77-84.
- Ehrenfeld M., Mast G.:
Gestielte muskulokutane und fasciokutane Lappen.
Mund Kiefer Gesichts Chir. 4 (2000), 299-305.
- Eriksson E., Hedén P.:
Method for skin blood flow studies in the pig.
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 22 (1988), 229-32.
- Fawcett W.J., Quiney N.F., Karanjia N.D.:
Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver.
Br. J. Surg. 92 (2005), 528-538.
- Futran N.D., Stack B.C., Hollenbeak C., Scharf J.E.:
Green light photoplethysmography monitoring of free flaps.
Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. (United States) 126 (2000), 659-62.
- Harder Y., Amon M., Laschke M.W., Schramm R., Rücker M., Wettstein R., Bastiaanse J., Frick A., Machens H.G., Küntscher M., Germann G., Vollmar B., Erni D., Menger M.D.:
An old dream revitalised: preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury.
J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. 61 (2008), 503-11.
- Harralson T., Grossi F.V., Quan E.E., Tecimer T., Perez-Abadia G., Anderson G., Barker J.H., Maldonado C.:
Ischemic preconditioning of skeletal muscle: duration of late-phase protection.
Ann. Plast. Surg. 55 (2005), 216-222.

- Harris A.G., Steinbauer M, Leiderer R; Messmer K.:
Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.
Am. J. Physiol. 273 (1997), H989-996.
- Hassouna A., Loubani M., Matata B.M., Fowler A., Standen N.B., Galinanes M.:
Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium.
Cardiovasc. Res. 69 (2006), 450-8.
- Hidalgo D.A., Disa J.J., Cordeiro P.G., Hu Q.Y.:
A review of 716 consecutive free flaps for oncologic surgical defects: refinement in donor-site selection and technique.
Plast. Reconstr. Surg. 102 (1998), 722-732.
- Hirigoyen M.B., Urken M.L., Weinberg H.:
Free flap monitoring: a review of current practice.
Microsurgery 16 (1995), 723-726.
- Hirigoyen M.B., Blackwell K.E., Zhang W.X., Silver L., Weinberg H., Urken M.L.:
Continuous tissue oxygen tension measurement as a monitor of free-flap viability.
Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997), 763-773.
- Hölzle F., Rau A., Swaid S., Loeffelbein D.J., Nolte D., Wolff K.-D.:
Simultaneous noninvasive monitoring for radial forearm and fibula flaps using laser doppler flowmetry and tissue spectrophotometry.
Mund Kiefer Gesichtschir. 9 (2005), 290-299.
- Hölzle F., Loeffelbein D.J., Nolte D., Wolff K.-D.:
Free flap monitoring using simultaneous noninvasive laser doppler flowmetry and tissue spectrophotometry.
J. Craniomaxillofac. Surg. 34 (2006), 25-33.
- Hölzle F., Rau A., Loeffelbein D.J., Mücke T., Kesting M.R., Wolff K.-D. :
Results of monitoring fasciocutaneous, myocutaneous, osteocutaneous and perforator flaps : 4-year expérience with 166 cases.
Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 39 (2010), 21-8.
- Huda R., Solanki D.R., Mathru M.:
Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle.
Clin. Sci. 107 (2004), 497-503.

Johnson P.C., Barker J.H.:

Thrombosis and antithrombotic therapy in microvascular surgery.
Clin. Plast. Surg. 19 (1992), 799-807.

Jones N.F.:

Intraoperative and postoperative monitoring of microsurgical free tissue transfers.
Clin. Plast. Surg. 19 (1992). 783-797.

Kamoliz L.P., Giovanoli P., Haslik W., Koller R., Frey M.:

Continuous free-flap monitoring with tissue-oxygen measurements: three-year experience.
J. Reconstr. Microsurg. 18 (2002), 487-491, discussion 492-493.

Karcher H.:

Microsurgical bone replacement
Mund Kiefer Gesichtschir. 4 (2000), 322-30.

Kaufman T, Granick M.S., Hurwitz D.J., Klein M.:

Is experimental muscle flap temperature a reliable indicator of its viability?
Ann. Plast. Surg. 19 (1987), 34-41.

Khalil A.A., Aziz F.A., Hall J.C.:

Reperfusion injury.
Plast. Reconstr. Surg. 117 (2006), 1024-3.

Kerrigan C.L., Daniel R.K.:

Monitoring acute skin-flap failure.
Plast. Reconstr. Surg. 71 (1983), 519-24.

Kristiansen S.B., Lofgren B., Stottrup N.B., Khatir D., Nielsen-Kudsk J.E.,
Nielsen T.T., Botker H.E., Flyvbjerg A.:

Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes.
Diabetologia. 47 (2004), 1716-21.

Kryger Z., Dogan T., Zhang F., Komorowska-Timek E., Shi D.Y., Cheng C.,
Lineaweaver W.C., Buncke H.J.:

Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat.
Ann. Plast. Surg. 43 (1999), 172-178.

Koenig W.J., Lohner R.A., Perdrizet G.A., Lohner M.E., Schweitzer R.T., Lewis V.L.Jr.:

Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery.

Plast. Reconstr. Surg. 90 (1992), 659-664.

Lam L.K., Wei W.I., Chan V.S., Ng R.W., Ho W.K.:

Microvascular free tissue reconstruction following extirpation of head and neck tumor: experience towards an optimal outcome.

J. Laryngol. Otol. 116 (2002), 929-936.

Langer S.G., Carter S.J., Haynor D.R., Maravella K.R., Mattes D., Strandness E.D.Jr., Stewart B.K.:

Image acquisition: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging.

World J. Surg. 25 (2001), 1428-37.

Lidman D., Daniel R.K.:

Evaluation of clinical microvascular anastomoses--reasons for failure.

Ann Plast. Surg. 6 (1981), 215-23.

Lu A., Ran R.Q., Clark J., Reilly M., Nee A., Sharp F.R.:

17-beta-estradiol induces heat shock proteins in brain arteries and potentiates ischemic heat shock protein induction in glia and neurons.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 22 (2002), 183-195.

Lubbers D.W., Koster T., Holst G.A.:

O₂ flux optode: a new sensing principle to determine the oxygen flux and other gas diffusions.

Adv. Exp. Med. Biol. 388 (1996), 59-68.

Lubbers D.W.:

Oxygen electrodes and optodes and their application in vivo.

Adv. Exp. Med. Biol. 388 (1996), 13-34.

Marian C.F., Jiga L.P., Ionac M.:

Ischemic preconditioning of free muscle flaps: An experimental study.

Microsurgery 25 (2005), 524-531.

Matsumura H., Yoshizaw N., Vedder N.B., Watanabe K.:

Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap.

Br. J. Plast. Surg. 54 (2001), 58-61.

- Moon J.G., Lim H.D., Gye M.R., Oh J.S., Park J.W. :
Postconditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rat skin flap.
Microsurgery 28 (2008), 531-7.
- Morris S.D., Cumming D.V., Latchman D.S., Yellon D.M.:
Specific induction of the 70-kD heat stress proteins by the tyrosine kinase inhibitor herbimycin-A protects rat neonatal cardiomyocytes. A new pharmacological route to stress protein expression?
J. Clin. Invest. 97 (1996), 706-712.
- Mothes H., Donicke T., Friedel R., Simon M., Markgraf F., Bach O.:
Indocyanine-green fluorescence video angiography used clinically to evaluate tissue perfusion in microsurgery.
J. Trauma 57 (2004), 1018-24.
- Mounsey R.A., Pang C.Y., Boyd J.B., Forrest C.:
Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning.
J. Otolaryngol. 21 (1992), 315-320.
- Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.:
Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.
Circulation 74 (1986), 1124-1136.
- Neligan P.C.:
Monitoring techniques for the detection of flow failure in the postoperative period.
Microsurgery. 14 (1993), 162-4.
- Nolte D., Hecht R., Schmid P., Botzlar A., Menger M.D., Neumueller C., Sinowatz F., Vestweber D., Messmer K.:
Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/c mice.
Am. J. Physiol. 36 (1994), H1320-H1328.
- Nose P.S.:
Cytokines and reperfusion injury.
J. Card. Surg. 8 (1993), 305-308.

Padubidri A., Browne E.Jr.:

Effect of vascular endothelial growth factor on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat.

Ann. Plast. Surg. 37 (1996), 604-611.

Palace G.P., Delvecchio P.J., Horgan M.J., Malik A.B.:

Release of Tumor Necrosis Factor After Pulmonary Artery Occlusion and Reperfusion.

Am. Rev. Respir. Dis. 147 (1993), 143-147.

Peter F.W., Franken R.J., Wang W.Z., Anderson G.L., Schuschke D.A.,

O'Shaughnessy M.M., Banis J.C., Steinau H.U., Barker J.H.:

Effect of low dose aspirin on thrombus formation at arterial and venous microanastomoses and on the tissue microcirculation.

Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997), 1112-1121.

Picard-Ami L.A., Thomson J.G., Kerrigan C.L.:

Critical ischemia times and survival patterns of experimental pig flaps.

Plast. Reconstr. Surg. 86 (1990), 739-743, discussion 744-745.

Pinheiro B.B., Fiorelli A.I., Gomes O.M.:

Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts.

Rev. Bras. Cir. Cardiovasc. 24 (2009), 31-7.

Reuther J.:

Surgical therapy of oral carcinomas.

J. Craniomaxillofacial. Surg. 20 (1992), 24.

Riediger D., Ehrenfeld M.:

Mikrochirurgischer Weichgewebettransfer in die Mund-Kiefer-Gesichts-Region.

Fortschr. Kiefer Gesichtschir. 35 (1990), 39-44.

Ritter E.F., Kim Y.B., Reischl H.P., Serafin D., Rudner A.M., Klitzman B.:

Heparin coating of vascular prostheses reduces thromboemboli.

Surgery 122 (1997), 888-892.

Rücker M., Schafer T., Roesken F., Spitzer W.J., Bauer M., Menger M.D.:

Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32.

Surgery 129 (2001), 292-301.

- Rücker M., Schafer T., Roesken F., Spitzer W.J., Bauer M., Menger M.D.:
Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion
in osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32.
Br. J. Surg. 88 (2001), 450-457.
- Sablutzki A., Dehne M.G., Friedrich I., Grond S., Zickmann B., Muhling J., Silber
R.E., Czeslick E.G.:
Different expression of cytokines in survivors and non-survivors from MODS
following cardiovascular surgery.
Eur. J. Med. Res. 8 (2003), 71-76.
- Saita Y., Yokoyama K., Nakamura K., Itoman M.:
Protective effect of ischaemic preconditionin against ischaemia-induced
reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are
appropriate?
Br. J. Plast. Surg. 55 (2002), 241-5.
- Salmi A.M., Hong C., Futrell J.W.:
Properative cooling and warming of the donor site increase survival of skin
flaps by the mechanism of ischemic preconditioning: an experimental study
in rats.
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 33 (1999); 163-167.
- Schön R., Gutwald R., Schramm A., Düker J., Gellrich N.-C., Schmelzeisen R.:
Farbduplexsonographie zum Monitoring von vaskularisierten
Fibulatransplantaten.
Mund Kiefer Gesichtschir. 6 (2002), 319-322.
- Schultze-Mosgau S., Wiltfang J., Birklein F., Neukam F.W.:
Microlightguide spectrophotometry as an intraoral monitoring method in free
vascular soft tissue flaps.
J. Oral Maxillofac. Surg. 61 (2003), 292-297, discussion 297.
- Shalom A., Westreich M.:
Effect of high dose and low dose aspirin on survival of random pattern flaps
in rats.
Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 35 (2001), 117-121.
- Shen T.Y., Mitchell G.M., Morrison W.A., O'Brien B.M.:
The use of long synthetic microvascular grafts to vascularise free flaps in
rabbits.
Br. J. Plast. Surg. 41 (1988), 305-312.

- Solomon G.A., Yaremchuk M.J., Manson P.N.:
Doppler ultrasound surface monitoring of both arterial and venous flow in clinical free tissue transfers.
J. Reconstr. Microsurg. (United States) 3 (1986), 39-41.
- Steward R.J., Moore T., Bennett B., Easton M., Newton G.W., Yamaguchi K.T.:
Effect of free radical scavengers and hyperbaric oxygen on random pattern skin flaps.
Arch. Surg. 129 (1994), 982-987.
- Strauss J.M., Neukam F.W., Krohn S., Schmelzeisen R., Borchard F.:
Postoperative monitoring of microvascular flap repair with pulse oximetry—initial experience
Handchir. Mikrochir. Plast. Chir. (Germany) 26 (1994), 80-3.
- Suh J.D., Sercarz J.A., Abemayor E., Calcaterra T.C., Rawnsley J.D., Alam D., Blackwell K.D.:
Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction.
Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 130 (2004), 962-966.
- Tatlidede S., McCormack M.C., Eberlin K.R., Nguyen J.T., Randolph M.A., Austen W.G. Jr.:
A novel murine island skin flap for ischemic preconditioning.
J. Surg. Res. 154 (2009), 112-7.
- Tatsumi T., Matoba S., Kobara M., Keira N., Kawahara A., Tsuruyama K., Tanaka T., Katamura M., Nakagawa C., Ohta B., Yamahara Y., Asayama J., Nakagawa M.:
Energy metabolism after ischemic preconditioning in streptozotocin-induced diabetic rat hearts.
J. Am. Coll. Cardiol. 31 (1998), 707-15.
- Wang H., Li Z., Liu X.:
Effects of various protocols of ischemic preconditioning on rat tram flaps.
Microsurgery. 28 (2008), 37-43.
- Wang B.H., Ye C., Stagg C.A., Lin W., Fawcett T., Vanderkolk C.A., Udelsman R.:
Improved free musculocutaneous flap survival with induction of heat shock protein.
Plast. Reconstr. Surg. 101 (1998), 776-784.

- Wang W.Z., Anderson G., Maldonado C., Barker J.:
Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle.
Microsurgery 17 (1996), 324-329.
- Warner K.G., Durham-Smith G., Butler M.D., Attinger C.E., Upton J., Khuri S.F.:
Comparative response of muscle and subcutaneous tissue pH during arterial and venous occlusion in musculocutaneous flaps.
Ann. Plast. Surg. 22 (1989), 108-16.
- Yang C.W., Ahn H.J., Han H.J., Kim W.Y., Li C., Shin M.J., Kim S.K., Park J.H., Kim Y.S., Moon I.S., Bang B.K.:
Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/ reperfusion injury in rat kidney.
Transplantation 72 (2001), 1753-1759.
- Yuen J.C., Feng Z.:
Monitoring free flaps using the laser Doppler flowmeter: five-year experience.
Plast. Reconstr. Surg. 105 (2000), 55-61.
- Zahir T.M., Zahir K.S., Syed S.A., Restifo R.J., Thomson J.G.:
Ischemic preconditioning of musculocutaneous flaps: effects of ischemia cycle length and number of cycles.
Ann. Plast. Surg. 40 (1998), 430-435.
- Zamboni W.A., Roth A.C., Russell R.C., Smoot E.C.:
The effect of hyperbaric oxygen on reperfusion of ischemic axial skin flaps: a laser Doppler analysis.
Ann. Plast. Surg. 28 (1992), 339-341.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1

Gängige Spenderregionen für mikrochirurgische Transplantate, von unten links im Uhrzeigersinn: Fibula-Transplantat, M. vastus lateralis-Lappen, Radialis-Lappen, Oberarm-Lappen, Skapula-Transplantat, Latissimus dorsi-Lappen, Beckenkamm-Transplantat.

Abb. 2

Schematische Darstellung des mikrochirurgischen Gewebetransfers mit an die Halsgefäße anastomosiertem Transplantat.

Abb. 3

Rolling, Sticking und Emigration der Leukozyten in das Endothel mit Initiation des Gewebeschadens.

Abb. 4

Experimentelles Protokoll der IP bei Ischämie und Reperfusion am Hinterlauf der NMRI - Maus. Anzahl der Mäuse pro Gruppe (n=10).

Abb. 5

Messung von Hämoglobin-Oxygenierung und mikrovaskulärem Blutfluss bei der narkotisierten Maus mittels O2C.

Abb. 6

Blutentnahme aus der V. cava caudalis, Blick durch das Operationsmikroskop.

Abb. 7

Präparation von Muskelgewebe.

Abb. 8

Absorptionseigenschaft des Hämoglobins in Abhängigkeit vom Oxygenierungsgrad. Voll oxygeniertes Hämoglobin weist zwei Absorptionsmaxima bei 542 nm und 577 nm auf (rote Linie), desoxygeniertes Hämoglobin ein Maximum bei 556 nm (blaue Linie).

Abb. 9

Ansicht des O2C-Monitors mit Onlinepräsentation der Oxygenierungswerte und Blutflussparameter.

Abb. 10

Messverlauf der Hämoglobinoxygenierung der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * $p < 0,05$, Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 h und 2 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Abb. 11

Messverlauf des tiefen Flows der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * $p < 0,05$,

Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 und 2 h, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Abb. 12

Messverlauf von KC (Interleukin 8) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * $p < 0,05$ Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 0,5 h und 2 h sowie zu den IP-Gruppen bei 0,5 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Abb. 13

Messverlauf von sE-Selektin der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * $p < 0,05$ Kontrolle im Vergleich zum Basalwert bei 2 h und 48 h, Kontrolle und IP-Gruppen zum Basalwert bei 24 h und 96 h, IP-10/10 zur Kontrolle bei 48 h. Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Abb.14-17

Postischämisches Gewebe mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden. Die Schnittbilder zeigen eine Zunahme der Schwellung einzelner Muskelfasern, beginnende Myolysen und Infiltration von Entzündungszellen mit Muskelnekrosen (zur Quantifizierung siehe Score-Einteilung, Kapitel 4.3.5). HE-Färbung, Vergrößerung 200x.

Abb.18

Histomorphologische Schädigungen der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle entsprechend der Score-Einteilung 0-4 (n = 280). Entnahmezeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Score basal an einer Gruppe (n = 10) ermittelt. * $p < 0,05$, Kontrolle im Vergleich zu den drei Gruppen mit IP bei 48 h und 96 h. Varianzanalyse und Tukey-Test.

Tab. 1

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Hämoglobinoxygenierung (Hb-Ox) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

Tab. 2

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des tiefen Flows der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

Tab. 3

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von KC (Interleukin 8) der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

Tab. 4

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von sE-Selektin der drei Gruppen mit ischämischer Präkonditionierung und Kontrolle (n = 280). Messzeitpunkte: basal, nach ischämischer Präkonditionierung, nach Ischämie, nach 0,5 h, 2 h, 24 h, 48 h und 96 h. Basalwerte an einer Gruppe (n = 10) ermittelt.

9. Anhang

Arbeitsprotokoll: Experimentelle Studie Ischämische Präkonditionierung vor Ischämie- Reperfusion											
Versuchsbeginn:											
Versuchsgruppe:											
Tiernummer:											
fortlaufende Nummer:											
Versuchsablauf:	Datum/ Uhrzeit										
Narkose, Bemerkungen											
			O2	Hb	F2		V2	F8		V8	
Basalmessung O2C											
IP 2x 5/5											
Messzeitpunkt O2C nach IP											
4 h Ischämie											
Messzeitpkt. O2C nach 4 h Ischämie											
Messzeitpunkt O2C 1/2h											
Messzeitpunkt O2C 2h											
Messzeitpunkt O2C 24h											
Messzeitpunkt O2C 48h											
Messzeitpunkt O2C 96h											
Probenentnahmen	Entnahmezeit /-datum	Dechiffrierung Code					Bemerkung				
Serum-Proben											
Gewebe-Entnahme											
Euthanasie											

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Clarissa Antonia Hölzle geb. Temp
Geburtsdatum:	15.09.1981
Geburtsort:	Recklinghausen
Familienstand:	verheiratet, 1 Tochter Clara Luise Hölzle
Eltern:	Dr. Franz Temp, Zahnarzt Beate Temp geb. Sander, Beamtin des gehobenen Dienstes
Geschwister:	Laura Dominika Temp Julius Alexander Temp

Schulausbildung:

8/ 1987 – 7/ 1991:	Kath. Grundschule an der Kühlstraße in Recklinghausen
8/ 1991 – 6/ 2000:	Gymnasium Petrinum in Recklinghausen mit dem Abschluss der Allgem. Hochschulreife

Studium:

10/ 2000 – 11/ 2006 :	Medizinstudium an der Ruhr-Universität- Bochum
8/ 2002:	Ärztliche Vorprüfung
8/ 2003:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
8/ 2005:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/ 2006:	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

1/2007- 12/08: Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in
der Abteilung für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde der Ruhr-Universität-
Bochum im
St.Elisabeth Hospital, Bochum

Seit 2/09 Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in
der Abteilung für
Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der
Technischen Universität
München, Klinikum rechts der Isar, München

11. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn PD Dr. Dr. Frank Hölzle für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die hervorragende Betreuung und die wertvollen Anregungen bei der Konzeption und Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Klaus- Dietrich Wolff danke ich für die großzügige Bewegungsfreiheit innerhalb seiner Abteilung und seine Unterstützung während des gesamten Studienverlaufs.

Herrn Dipl. math. Tim Holland-Letz vom Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die freundliche Hilfe bei der Planung und Durchführung der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Ich danke Herrn PD Dr. Falko von Strahlendorff, seinem Mitarbeiter Herrn Dr. Michael Altrogge sowie den Tierpflegern für die kompetente Hilfe bei der Durchführung des tierexperimentellen Arbeitens.

Für die freundliche Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung des tierexperimentellen Teils danke ich den Präparatoren des Instituts für Anatomie der Ruhr- Universität- Bochum Frau Claudia Schneider und Herrn Helmut Riese.

Meiner Familie und insbesondere meinem Ehemann danke ich für die moralische Unterstützung und Motivation bei der Durchführung und Erstellung der Arbeit.