

**Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)**

Einfluss von verschiedenen Antikoagulanzen auf ischämische mikrovaskuläre Gewebetransplantate

—

Eine tierexperimentelle Vergleichsstudie

Luisa Katharina Robitzky

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. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. Thomas Mücke
2. Univ. - Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 19.03.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.06.2015 angenommen.

Teile der Arbeit wurden vorgetragen bzw. veröffentlicht in:

Die Applikation verschiedener Antikoagulanzen und deren Einfluss auf das Überleben von Gewebetransplantaten im Rattenmodell

Mücke, Thomas; Robitzky, L.; Borgmann, A.; Fichter, A.; Ritschl, L.; Wolff, K.-D.

DGMKG, 12.06.2014, Mainz (Poster und Vortrag)

Inhalt

Inhalt	3
1 Einleitung	5
1.1 Transplantate	5
1.2 Transplantatarten	5
1.2.1 Gestielte Lappen: Axial und Random Pattern Flap	5
1.2.2 Mikrovaskuläre Transplantate und freie Lappen	6
1.3 Risikofaktoren für den Transplantatverlust	10
1.3.1 Thrombosierung	10
1.3.2 Begleiterkrankungen	10
1.3.3 Vasospasmen	11
1.3.4 Vorschädigungen	12
1.4 Therapieansätze	12
1.4.1 Blutegeltherapie	12
1.4.2 Calciumantagonisten	13
1.4.3 VEGF	13
1.4.4 Gerinnungssystem und Antikoagulanzen	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Tierart und Anzahl	20
2.1.2 Tierhaltung	20
2.1.3 Gruppeneinteilung und Medikation	21
2.2 Methoden	24
2.2.1 Narkoseverfahren	24
2.2.2 Dokumentation	25
2.2.3 Durchführung	28
2.2.4 Explantation und Euthanasie der Tiere	31
2.2.5 Datenverarbeitung	31
3 Ergebnisse:	32
4 Diskussion:	42
4.1 ASS	43
4.2 Clopidogrel	45
4.3 Heparin	49
4.4 Hirudin	53
4.5 Pentoxifyllin	54
4.6 Hydroxyethylstärke (HES 6%)	59
4.7 Fazit	62
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis	66

7	Abkürzungsverzeichnis.....	70
8	Danksagungen	72
9	Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Die rekonstruktive Chirurgie ist wesentlicher Bestandteil des bestehenden onkologischen Versorgungskonzeptes in der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen mit dem Ziel der vollständigen funktionellen und ästhetischen Rehabilitation nach erfolgter radikaler Tumorresektion in der Mundhöhle (MUCKE *et al.* 2011). Die durch die Tumorinvasion bedingte Destruktion, sowie der notwendigen Resektion des malignen Geschehens wird aus funktioneller und ästhetischer Sicht eine entsprechende Rekonstruktion der Defektregion notwendig, da sonst eine erhebliche Einbuße der Lebensqualität der Patienten zu erwarten wäre. Als Therapie der Wahl hat sich der freie mikrochirurgische Gewebettransfer etabliert.

1.1 Transplantate

Zur Rekonstruktion entstandener Defekte eignen sich autologe Gewebetransplantate, so genannte „Lappen“ oder „Flaps“. Diese Lappen können in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden (DAVID H. SONG *et al.* 2007).

1.2 Transplantatarten

Definition des Begriffs "Lappen":

Definitionsgemäß bezeichnet man jeden mobilisierbaren Gewebeverband, der von einer Region entnommen und zur Deckung einer anderen Region genutzt werden kann, als einen Lappen. Dieser kann isoliert oder auch in Kombination aus Haut, Muskel, Faszie oder Knochen bestehen. Man unterscheidet zwischen dem regional verschieblichen Lappen, der überwiegend zur Deckung kleinerer Defekte angewendet wird und dem freien Lappen (SOUTAR UND MCGREGOR 1986).

1.2.1 Gestielte Lappen: Axial und Random Pattern Flap

Gestielte Lappen finden Anwendung in der **Nahlappenplastik**, das bedeutet, der Explantationsort befindet sich in unmittelbarer Nähe zum zu deckenden Defekt. Die Deckung erfolgt mittels Rotation oder Verschiebung (DAVID H. SONG *et al.* 2007). Die ursprüngliche Versorgung über die Gefäße und Nerven der Ursprungsregion des Transplantats bleibt erhalten. Das Transplantat wird mit einem Stiel aus Nerven und

Gefäßen an die Stelle des Defekts transferiert. Dabei klassifiziert man anhand der Gefäßversorgung folgende Modelle:

1.2.1.1 Random Pattern Flap

Die Gefäßversorgung erfolgt hier nicht über ein definiertes, basal gestieltes Gefäß, sondern zufallsverteilt. Die dimensionale Ausdehnung des Transplantats ist hierdurch eingeschränkt (DAVID H. SONG *et al.* 2007), weshalb sich der Random Pattern Flap nur für kleine Defektareale eignet. Das Verhältnis der Lappenlänge zur Lappenbasis sollte 2:1 bis maximal 3:1 nicht überschreiten, um die Perfusion im Bereich der Lappenspitze nicht zu kompromittieren und Nekrosen zu riskieren (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012).

1.2.1.2 Axial Pattern Flap

Die Versorgung des Transplantats wird durch die Achse eines definierten Gefäßes gewährleistet, welches basal in das Transplantat einmündet und anschließend aus dieser Achse seine Äste abgibt. Dies erlaubt dem Operateur die Größe des Transplantates soweit in Länge und Breite auszudehnen, wie die Gefäßversorgung es zulässt. Der Axial Pattern Flap wird bei größeren Defektarealen verwendet (BLONDEEL *et al.* 1997; DAVID H. SONG *et al.* 2007).

1.2.2 Mikrovaskuläre Transplantate und freie Lappen

Ist der zu Defekt zu groß, um durch Ort eine Nahlappenplastik gedeckt zu werden, muss eine Fernlappenplastik mittels freier Lappen oder mikrovaskulärer Transplantate erfolgen (DAVID H. SONG *et al.* 2007).

Fernlappentransplantate werden am Gefäßstiel von der ursprünglichen Blutversorgung losgelöst und an der Stelle des Defekts inseriert. Als Abwandlung dazu wird das mikrovaskuläre Transplantat, im Gegensatz zum Fernlappen, zusätzlich mit lokalen Gefäßen anastomosiert (DAVID H. SONG *et al.* 2007). Die Anastomosierung wird bei ähnlichem Durchmesser der zu anastomosierenden Gefäßlumina in End-zu-End-Technik durchgeführt (siehe Abbildung 1).

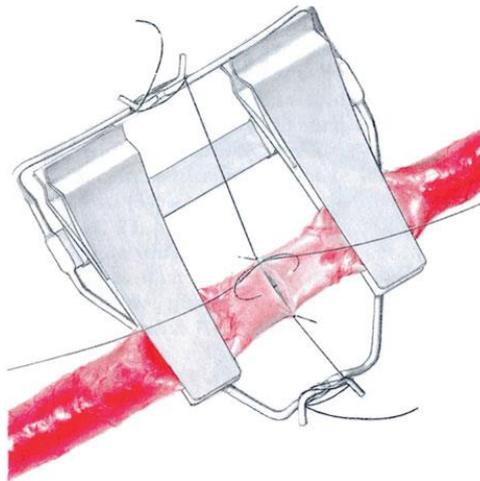


Abbildung 1: End-zu-End-Anastomose nach Cobbett (J.-E. HAUSAMEN et al. 2012)

Bei starker Abweichung des luminalen Durchmessers oder bei erforderlicher Aufrechterhaltung der Kontinuität einer funktionellen Endarterie werden verschiedene Techniken angewendet oder die End-zu-Seit-Technik zur Anastomosierung genutzt (J.-E. HAUSAMEN et al. 2012) (siehe Abbildung 2).

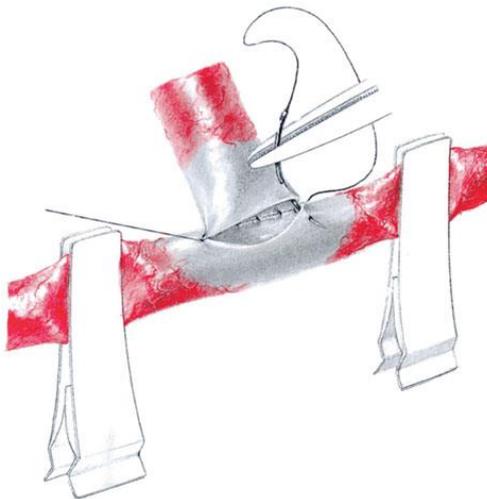


Abbildung 2: End-zu-Seit-Anastomose (J.-E. HAUSAMEN et al. 2012)

Das Transplantat kann dabei aus unterschiedlichen Gewebekomponenten bestehen.

- Faszioskutan (geeignet zu Versorgung oberflächlicher Defekte, bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist der an der A. radialis gestielte Unterarmlappen (SOUTAR *et al.* 1983; SOUTAR UND MCGREGOR 1986))
- Myokutan (geeignet bei Defekten, die neben einem ausgedehnten Verlust von Haut bzw. Schleimhaut durch ihre Tiefenausdehnung charakterisiert sind; Bsp: M.latissimus dorsi-Lappen, M. rectus abdominis-Lappen, M. vastus lateralis-Lappen) (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012)
- Osseoseptokutan (eingesetzt auf dem Gebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zur Versorgung von Knochendefekte, bevorzugter Weise Skapula-, Beckenkamm- und Fibulatransplantat) (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012)

1.2.2.1 Perforanslappen

Perforanslappen bestehen in der Regel aus Haut und/oder subkutanem Fettgewebe. Die Versorgung wird über einzelne definierte Endstromgefäße gewährleistet, welche die tiefe Faszie durchdringen. Die Lokalisation des Gefäßes ist dabei stets variabel, was bei der Hebung beachtet werden muss (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012). Nach HALLOCK (2003) werden direkte von indirekten Perforatorgefäßen unterschieden: Der Verlauf direkter Perforatorgefäße reicht vom Hauptgefäß - die Faszie perforierend - durch das subkutane Fettgewebe zur Haut, während indirekte Perforatorgefäße tiefer liegen und zwischen Faszienräumen und Muskulatur verlaufen, ehe sie die tiefe Faszie durchdringen und nach superfizial gelangen. Perforatorgefäße müssen bei der Präparation immer zu ihrem Ursprungsgefäß verfolgt werden. Dementsprechend muss bei indirekten Perforanslappen zur Präparation des Gefäßes Muskelgewebe durchtrennt werden (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012). Der entstehende Entnahmedefekt ist gering. Der Perforanslappen kann sowohl für extra- als auch für intraorale Rekonstruktionen eingesetzt werden (DAVID H. SONG *et al.* 2007).

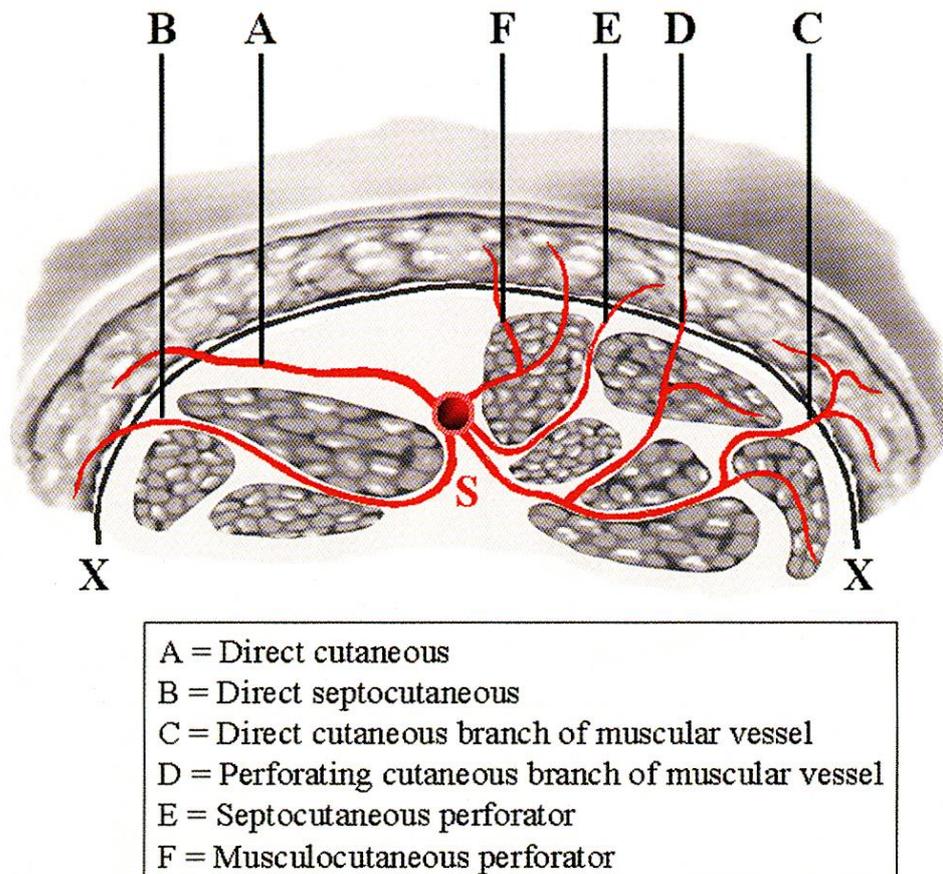


Abbildung 3: Darstellung unterschiedlicher Perforatortypen (HALLOCK 2003)

1.3 Risikofaktoren für den Transplantatverlust

1.3.1 Thrombosierung

Die Rate an Transplantatverlusten in der rekonstruktiven Mikrochirurgie beträgt etwa 10% (ASKARI *et al.* 2006). Einer der häufigsten Gründe hierfür ist der **thrombotische Verschluss** eines Gefäßstieles des Transplantates (ASKARI *et al.* 2006).

Insbesondere perioperativ ist das Risiko für die Bildung eines Blutkoagels, bedingt durch den initial geringen Blutfluss durch das anastomosierte Gefäß, hoch (ASKARI *et al.* 2006). Durch die möglicherweise erfolgte Traumatisierung des Endothels im Rahmen der operativen Intervention ist das Risiko einer Thrombenbildung innerhalb der ersten postoperativen Phase über 48 Stunden zusätzlich erhöht (LEWIS UND DESCHLER 2008). Eine optimal eingestellte antikoagulative Therapie senkt das Risiko eines Transplantatverlustes signifikant (ASKARI *et al.* 2006). Oberste Priorität bei der Durchführung des gesamten Eingriffes hat daher von Beginn an die vorsichtige und atraumatische Handhabung des Gewebes. Verletzungen, vor allem der Intima, ein Lösen der Intima von der Media, das versehentliche Einbringen extraluminale Gewebes in das Gefäßlumen sowie das Lösen eines artherosklerotischen Plaques im Anastomosengebiet können Thrombosierungen auslösen und somit den Verlust des Transplantates mit sich führen (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012).

1.3.2 Begleiterkrankungen

Adipositas, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus sind nicht nur mit einem erhöhten Karzinomrisiko behaftet, sondern auch allgemein bekannte Risikofaktoren für eine verschlechterte Immunlage, schlechte Wundheilung und Atherosklerose. Häufig handelt es sich also bei Tumorpatienten in der rekonstruktiven Chirurgie um Patienten, bei denen eben genau diese Komorbiditäten vorhanden sind (ROSENBERG *et al.* 2009; MUCKE *et al.* 2012). Diese Tatsache lässt vermuten, dass das Outcome der mikrochirurgischen Rekonstruktion aufgrund dieser Faktoren deutlich schlechter ist, als bei Patienten ohne Begleiterkrankungen.

Allerdings ließ sich bisher kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Rate an Transplantatverlusten, Nikotinabusus und Diabetes mellitus nachweisen (KHOURI *et al.* 1998; ROSENBERG *et al.* 2009; PATTANI *et al.* 2010). Adipöse Patienten scheinen verstärkt zur Hämatombildung in der Wundregion zu neigen (KHOURI *et al.* 1998).

Als relevant für die Vorhersage von möglichen Komplikationen in der mikrochirurgischen Rekonstruktion erwies sich jedoch die American-Society-of-Anaesthesiologists-Klassifikation (ASA-Klassifikation). Ein hoher ASA-Status geht mit einem erhöhtem Verlust- und Revisionsrate für das Transplantat einher (SERLETTI *et al.* 2000; SUH *et al.* 2004; CLARK *et al.* 2007; JONES *et al.* 2007; POHLENZ *et al.* 2007; ROSENBERG *et al.* 2009).

ASA 1	gesunder Patient
ASA 2	Patient mit leichter Systemerkrankung (z.B. eingestellter Hypertonus)
ASA 3	Patient mit schwerer Systemerkrankung und Leistungseinschränkung (z.B. Angina pectoris)
ASA 4	Patient mit schwer beeinträchtigender, lebensbedrohlicher Erkrankung (z.B. dekompensierte Herzinsuffizienz)
ASA 5	moribunder Patient, bei dem die Lebenserwartung ohne Behandlung geringer als 24 h ist (z.B. rupturiertes Aortenaneurysma)

Abbildung 4: ASA-Klassifikation (STRIEBEL 2012)

1.3.3 Vasospasmen

Schon bei der Präparation sollte auf einen sorgfältigen und atraumatischen Umgang mit dem Gewebe geachtet werden, da sich sonst später Probleme bei der Perfusion des Lappens ergeben können (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012).

Spasmen der Anschlussgefäße sind ein häufiger beobachtetes Problem.

Ursächlich hierfür ist oftmals der inadäquate und traumatische Umgang mit den Gefäßen.

Seltenes Spülen und Kälte führen zur Austrocknung des Gewebes, mechanische Irritation zu Vasokonstriktionen. (RUBY *et al.* 1984; J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012) Als prädisponierender Faktor für Vasospasmen gelten generalisierte Erkrankungen des Gefäßsystems (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012).

1.3.4 Vorschädigungen

Ein weiteres, typisches Problem für die mikrochirurgische Rekonstruktion onkologischer Patienten in der Kopf-/Halsregion stellen Vorbehandlungen, insbesondere Radiatio und Neck-Dissection, dar. Die Verfügbarkeit potentieller Anschlussgefäße ist durch fibrotisch bedingte Stenosierungen teilweise auf bis zu 36% reduziert (HANASONO *et al.* 2009). Fibrosen und Narbenbildungen erschweren die Durchführung einer sauberen, atraumatischen Präparation und Anastomosierung (HANASONO *et al.* 2009) und verlängern die Operationsdauer (MUCKE *et al.* 2012). Bei gelungener Anastomosierung wird der Einheilungsprozess aufgrund schlechterer Perfusionsverhältnisse und Wundheilungsstörungen verkompliziert und das Risiko für einen Transplantatverlust steigt (LEE UND THIELE 2010). Als weitere Komplikation gilt die Wundinfektion, begünstigt durch die radiotherapeutisch induzierte Immunsuppression und Gewebedestruktion, Neck Dissection, längere Operationsdauer sowie durch einen hohen ASA-Score (BOURGET *et al.* 2011; MUCKE *et al.* 2012).

1.4 Therapieansätze

1.4.1 Blutegeltherapie

Die Blutegeltherapie ist bereits seit langer Zeit bekannt. Seit dem zwanzigsten Jahrhundert findet die sie mit Erfolg in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie Anwendung (GROBE *et al.* 2012; ABDUALKADER *et al.* 2013). Bevorzugt eingesetzt wird die in Europa vorkommende Spezies *Hirudo medicinalis* (GROBE *et al.* 2012; ABDUALKADER *et al.* 2013). Innerhalb von 10 – 30 Minuten können die Egel bis zu 20ml Blut saugen. Sind sie vollgesaugt fallen sie von selbst von der betroffenen Hautstelle ab (ABDUALKADER *et al.* 2013). Der Speichel enthält antithrombotische und gerinnungshemmende Substanzen wie Hirudin, Bufrudin, Calin, Saratin und Lefaxin sowie antiinflammatorische Komponenten (Bdellin, Eglin, Komplement-Inhibitoren)(GROBE *et al.* 2012; ABDUALKADER *et al.* 2013). Die Gefahr venöser Thrombenbildung wird reduziert (ABDUALKADER *et al.* 2013), das venöse System entlastet und die Mikrozirkulation angeregt (GROBE *et al.* 2012).

1.4.2 Calciumantagonisten

Calciumkanalblocker können in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: Die Dihydropyridine (Nifedipin, Amlodipin, Nitrendipin etc.) und die kationisch amphiphilen Verbindungen (Verapamil, Diltiazem). Dihydropyridine blockieren vaskuläre L-Typ-Calciumkanäle und führen über die Erschlaffung der glatten Muskulatur zur Vasodilatation. Peripherer Widerstand und Nachlast nehmen ab. Die Anwendung von Dihydropyridinen ist bei Hypertonie und stabiler Angina pectoris indiziert (LÜLLMANN *et al.* 2010).

Verapamil und Diltiazem wirken stärker an kardialen L-Typ-Calcium-Kanälen und senken somit die kardiale Chrono-, Dromo- und Inotropie. Sie werden als Antiarrhythmika eingesetzt.

Die lokale Applikation eines Calciumkanalblockers vom Nifedipin-Typ bei Vasospasmen der Anschlussgefäße im mikrochirurgischen Lappentransplantat ist sinnvoll (J.-E. HAUSAMEN *et al.* 2012).

1.4.3 VEGF

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Als Ligand der Rezeptortyrosinkinase stimuliert VEGF die Angiogenese, indem es das Aussprossen von Kapillaren und die Proliferation von Endothelzellen fördert (RASSOW *et al.* 2008). Bei Gewebeverletzungen und Hypoxie sezernieren die Zellen vermehrt VEGF und stimulieren so die Wundheilung (ERDMANN *et al.* 2003; RASSOW *et al.* 2008).

Die Auswirkungen von VEGF auf die Einheilung der Transplante sind teilweise noch unbekannt (ZHANG *et al.* 2004). Dennoch zeigten tierexperimentelle Versuche positive Auswirkungen auf das Transplantatüberleben und kleinere Flächen nekrotischer Areale unter VEGF-Therapie (ZHANG *et al.* 2003; LINEAWEAVER *et al.* 2004; MUCKE *et al.* 2013).

1.4.4 Gerinnungssystem und Antikoagulanzen

1.4.4.1 Gerinnungssystem

Das Gerinnungssystem basiert auf einem Gleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse. So schützt es den Körper vor starken Blutungen und Thrombosebildung.

Bestandteile des Systems sind dabei Thrombozyten, Endothelzellen und das plasmatische Gerinnungssystem.

Bei Verletzungen werden am Endothel Tissue Factor freigelegt, an den sich Thrombozyten unter Vermittlung des adhäsionsfördernden von-Willebrandt-Faktors anheften.

Die Thrombozyten sezernieren daraufhin vermehrt den von-Willebrand-Faktor, vasokonstringierend und somit auf den Blutstrom verlangsamernd wirkende Stoffe wie Serotonin und Thromboxan A₂, sowie Botenstoffe, die die Aktivierung weiterer Thrombozyten fördern (ADP). Dadurch entsteht ein instabiler weißer Thrombus.

Die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren läuft in einer Kaskade ab. Hierbei können das intrinsische und das extrinsische System unterschieden werden (SILBERNAGL UND DESPOPOULOS 2007).

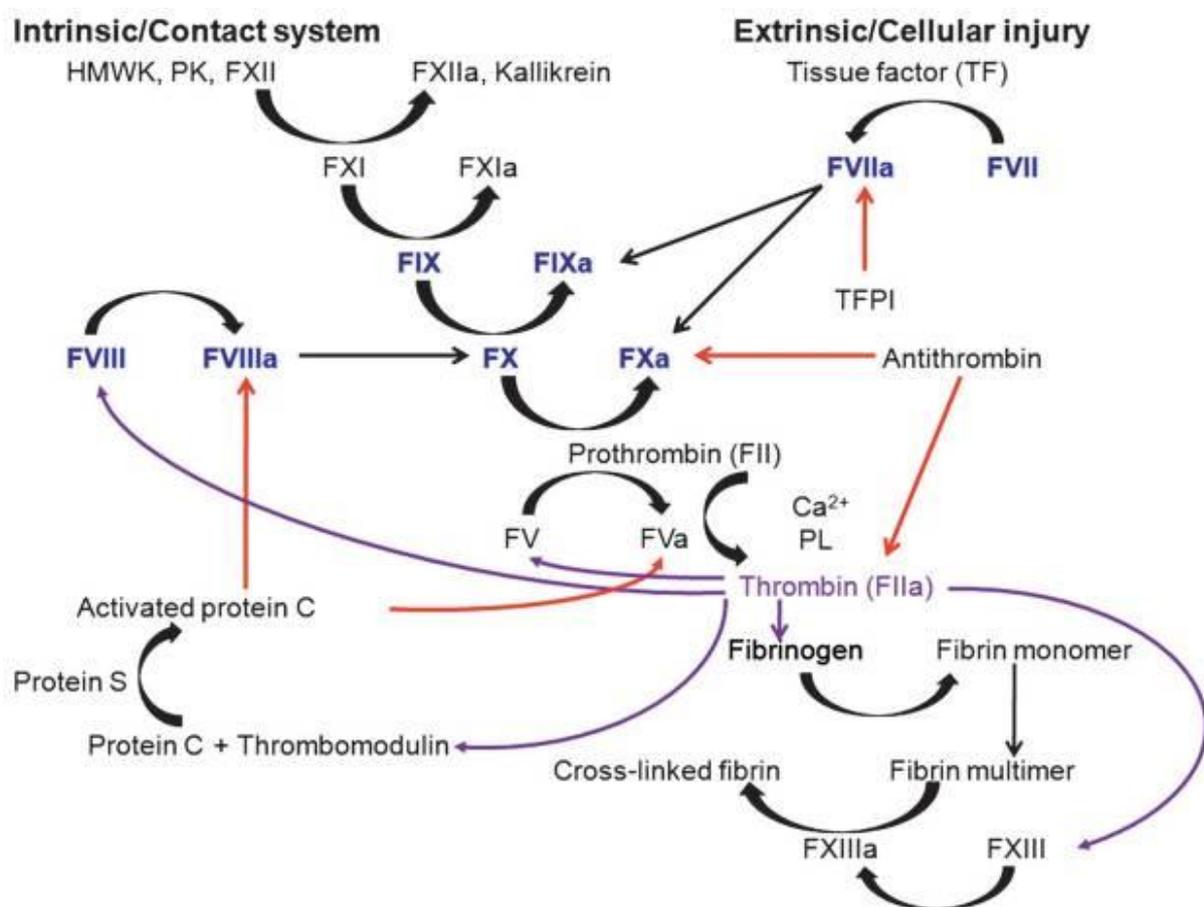


Abbildung 5: Gerinnungskaskade (NICHOLS et al. 2009)

Am Ende einer gemeinsamen Endstrecke entsteht als Produkt Thrombin, welches die Thrombozytenaggregation fördert.

Thrombin wiederum induziert die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrinmonomeren, die sich netzartig um den weißen Thrombus legen und ihn somit stabilisieren. Es entsteht ein stabiler roter Thrombus.

Inhibitoren der Gerinnung sind Protein C, Protein S und Antithrombin III, das Thrombin und Faktor Xa inaktiviert.

Plasmin entsteht unter Einfluss von Faktor XIIIa, Kininogen, Kallikrein, Urokinase oder t-PA aus Plasminogen und löst das gebildete Fibrin wieder auf (SILBERNAGL UND DESPOPOULOS 2007).

1.4.4.2 Antikoagulanzen und Rheologika

Die Verwendung von Antikoagulanzen und Rheologika stellen zwar in vielen anderen Fachbereichen einen etablierten Therapiebereich dar, sind jedoch in der rekonstruktiven Chirurgie nicht einheitlich etabliert und variieren nach individueller klinischer Expertise des Operationsteams (KNIGHT 1994; ASKARI *et al.* 2006; BRANDS *et al.* 2010; MUCKE *et al.* 2011). Prinzipiell sollte dem Patienten ein individuell „maßgeschneidertes“ Regime ermöglicht werden. Das optimale Agens bzw. die optimale Kombination aus Antikoagulanzen bzw. Rheologika sollte folgende Eigenschaften erfüllen:

1. Hemmung der Plättchenfunktion
2. Erhöhung des Blutflusses bzw. Erniedrigung der Blutviskosität
3. Hemmung der plasmatischen Gerinnung, v.a. der Bildung des Prothrombinkomplexes und Thrombin
4. ein günstiges Nebenwirkungsprofil und geringe Komplikationsrate
5. eine gut durchführbare Applikationsform
6. die ausbleibende Gefährdung des Patienten für eventuelle Nachblutungen (KETCHUM 1978)

Während einige Kliniken die Applikation von Heparin entweder in fraktionierter oder unfraktionierter Form verabreichen, erfolgt in anderen Kliniken und Fachbereichen, wie zum Beispiel der Neurochirurgie, zur Verbesserung der Mikrozirkulation die Antikoagulation mittels Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure oder auch Clopidogrel (KHOURI *et al.* 1998; KHOURI *et al.* 2001; NAYAK UND DESCHLER 2005; CHERNICHENKO *et al.* 2008; MUCKE *et al.* 2011). Auch Dextrane fanden als Rheologika zur Verbesserung der Mikrozirkulation im Gewebe Anwendung, ebenso Pentoxifyllin und Hirudin (HAYDEN UND SNYDER 1993;

NAHABEDIAN *et al.* 2004). Bei den Antikoagulanzen, deren Effizienz in der Thromboseprophylaxe mikrochirurgischer Lappentransplantate einzeln und in Kombination untersucht werden soll, handelt es sich um ASS, unfraktioniertes und fraktioniertes Heparin und Dextran, da diese in der Mikrochirurgie am häufigsten zur Prävention von Thrombenbildung Verwendung finden (HUPKENS UND COOLEY 1996; CONRAD UND ADAMS 2001; ASKARI *et al.* 2006; STEPHAN *et al.* 2009). Außerdem sollen Pentoxifyllin, Hirudin und Clopidogrel, die in Studien thrombophylaktisch und rheologisch positive Eigenschaften zeigten (MURTHY *et al.* 2003; NAYAK UND DESCHLER 2005; MOORE UND DESCHLER 2007; LEWIS UND DESCHLER 2008). Obwohl in der rekonstruktiven Mikrochirurgie Antikoagulanzen zur Verbesserung der rheologischen Situation innerhalb des Transplantates verwendet werden, hat sich klinisch bisher kein Behandlungsschema etabliert, welches zu einem standardisierten Therapieregime führte (MURTHY *et al.* 2003; RIDHA *et al.* 2006; LEWIS UND DESCHLER 2008; PEDERSON 2008; KRUSE *et al.* 2010). Die Art der Anwendung von Antikoagulanzen variiert aktuell sehr stark in den verschiedenen Therapiezentren, zu den am häufigsten verwendeten Substanzen jedoch zählen ASS, Heparin und Dextran (MUCKE *et al.* 2011). Das Problem bei der Verwendung dieser Medikamente ist allerdings eine Dosierung zu finden, die den gewünschten antithrombotischen Effekt erzielt und gleichzeitig die unerwünschten Risiken so gering wie möglich zu halten (ASKARI *et al.* 2006).

1.4.4.3 Acetylsalicylsäure (ASS)

Das Salicylat ASS, der am häufigsten verwendete Plättchenaggregationshemmer, hemmt das Enzym Cyclooxygenase irreversibel und setzt somit durch konsekutive Hemmung der Thromboxanbildung die Plättchenaktivierung und -funktion herab. Daher wirkt es bereits in einer Dosis von 50-100mg antikoagulativ. Über die Synthesehemmung von Prostaglandinen wirkt ASS in höheren Dosen außerdem antipyretisch, analgetisch und antirheumatisch. Da es effektiv eine arterielle Koagelbildung verhindert, findet Aspirin allein oder in Kombination häufig Verwendung bei mikrochirurgischen Eingriffen an Arterien (CHIEN *et al.* 2005). Niedrig dosiertes ASS wird von vielen Operateuren bevorzugt, da es sowohl die muskuläre als auch die endotheliale Cyclooxygenase, und somit die unerwünschte Hemmung der vaskulären Prostacyclinsynthese („Aspirin-Dilemma“), weniger in ihrer Funktion beeinträchtigt, als die thrombozytäre Aktivität (ASKARI *et al.* 2006). Tierversuche

zeigten bereits einen positiven Effekt in der Prävention von Thrombenbildung bei mikrochirurgischer Lappentransplantation, dennoch ist bisher unklar, ob sich diese Ergebnisse auch in dieser Form auf den menschlichen Organismus übertragen lassen (PEDERSON 2008). Des Weiteren wurde beschrieben, dass ASS in der Prävention mikrochirurgischer Thrombenbildung weniger effektiv sei als Heparin, da unter es unter der Behandlung mit ASS zu einer stärkeren Fibrinakkumulation in den Gefäßen komme (ASKARI *et al.* 2006).

1.4.4.4 Clopidogrel

Clopidogrel repräsentiert eine neuere Klasse der Plättchenaggregationhemmer. Als ein ADP-Rezeptorantagonist blockiert Clopidogrel irreversibel den P2Y₁₂-Rezeptor und wird vor allem zusätzlich zu ASS bei akutem Koronarsyndrom sowie bei ASS-Unverträglichkeit eingesetzt (MEHTA *et al.* 2010). Eine signifikante Reduktion thrombotischer Ereignisse bei mikrovaskulären Anastomosen ist in der Literatur beschrieben (NAYAK UND DESCHLER 2005; MOORE UND DESCHLER 2007).

1.4.4.5 Heparin

Das Glycosaminoglykan Heparin ist zurzeit das am häufigsten verwendete Antikoagulanzen zur Prävention von arterieller und venöser Thrombosierung (STOCKMANS *et al.* 1997). Es findet sowohl in niedermolekularer als auch in unfraktionierter Form systemisch oder lokal als Bestandteil der Spülung Anwendung in der Thromboseprophylaxe (BRANDS *et al.* 2010), wobei das unfraktionierte Heparin am häufigsten im Antikoagulationsregime Verwendung findet (STEPHAN *et al.* 2009). Durch die gleichzeitige Bindung von Antithrombin III, Thrombin und den Gerinnungsfaktor X reduziert unfraktioniertes Heparin die Entstehung von Fibringerinnseln, während niedermolekulares Heparin mit höherer Selektivität Faktor X inhibiert. Die Aktivität von Heparin ist jedoch reduziert, wenn Thrombin bereits an Fibrin gebunden ist (LEWIS UND DESCHLER 2008). Zusätzlich besitzt Heparin vasodilatatorische Eigenschaften und kann somit die Perfusionsrate im Gefäß erhöhen (ASKARI *et al.* 2006). Topisch angewandtes Heparin findet aufgrund seiner bewiesenen Effektivität in der Thromboseprophylaxe und Gefäßdurchlässigkeit häufig Gebrauch (MURTHY *et al.* 2003), jedoch kann der hierbei entstehende Druck das Endothel schädigen (ASKARI *et al.* 2006). Die Nachteile von unfraktioniertem

Heparin sind eine geringe Bioverfügbarkeit, eine unvorhersehbare Dosis-Wirkungs-Beziehung und das Risiko einer Heparin-induzierten-Thrombozytopenie (HIT) (MURTHY *et al.* 2003; ASKARI *et al.* 2006; LEWIS UND DESCHLER 2008). Aufgrund des Nebenwirkungsprofils könnte daher die Anwendung von niedermolekularem Heparin vorteilhaft sein, da es unter anderem mit einem geringeren Risiko für eine Heparin-induzierten-Thrombozytopenie Typ II Risiko einhergeht, die Bioverfügbarkeit um ein Vielfaches höher ist, es eine längere Halbwertszeit im Plasma besitzt und die Dosis-Wirkungs-Beziehung besser einschätzbar ist. Das Blutungsrisiko ist bei beiden Substanzen etwa gleich hoch. (ASKARI *et al.* 2006; TREMBLAY *et al.* 2008).

1.4.4.6 Hirudin

Hirudin ist ein selektiver Thrombin-Inhibitor. Da die antikoagulative Wirkung von Hirudin unabhängig von Antithrombin III ist und ebenfalls Fibrin gebundenes Thrombin mit einschließt, ist Hirudin ein potenteres Antikoagulanz als Heparin oder ASS (WALENGA *et al.* 1989; DI NISIO *et al.* 2005; ASKARI *et al.* 2006; LEWIS UND DESCHLER 2008). Die therapeutische Wirkung von subkutan verabreichtem Hirudin tritt bereits nach 30 Minuten ein, die Halbwertszeit beträgt ca. ein bis zwei Stunden (LEWIS UND DESCHLER 2008). Ein positiver Einfluss auf die Durchgängigkeit von mikrochirurgischen Anastomosen ist in der Literatur beschrieben (FU *et al.* 1995; LEWIS UND DESCHLER 2008). Fälle einer durch Hirudin verursachte Thrombozytopenie sind nicht bekannt (LEWIS UND DESCHLER 2008).

1.4.4.7 Hydroxyethylstärke (z.B. HES-steril 6%)

Das Stärkepräparat wird aus in Mais, Getreide und Reis enthaltener Stärke hergestellt und durch Hydroxyethylierung vor dem Abbau durch das körpereigene Enzym Alphaamylase geschützt. HES gehört zu den kolloidalen Plasmaersatzmitteln und besitzt eine hohe Wasserbindungsfähigkeit. Es fungiert daher als Plasmaexpander. Eine Beeinträchtigung der Blutgerinnung wird, vor allem bei Präparaten mit hohem Molekulargewicht von 450 kD, diskutiert. Die Elimination erfolgt renal, sehr selten treten anaphylaktoide Reaktionen auf. Die Höchstdosis fast aller HES-Präparate beträgt ca. 2g/kg Körpergewicht (also ca. 33ml/kg Körpergewicht HES 6%). Bei dem HES-Präparat Voluven® (130 kD) ist die Tageshöchstdosis mit 50ml/kg KG angegeben (STRIEBEL 2012). Aufgrund seines

Nebenwirkungsprofils wird die Anwendung von HES seit Juni 2013 nicht mehr empfohlen.

1.4.4.8 Pentoxifyllin

Pentoxifyllin gehört zur Gruppe der Rheologika und kann den Blutfluss durch Vasodilation, Hemmung der Plättchenaggregation, Erhöhung der Erythrozytenflexibilität und Reduktion der Fibrinogenkonzentration verbessern (DETTELBACH UND AVIADO 1985; ASKARI *et al.* 2006). Es findet typischerweise Anwendung bei arteriellen Verschlusskrankungen (ASKARI *et al.* 2006). Über eine positive Wirkung auf die Mikrozirkulation und Oxygenierung von freien Lappen wurde diskutiert (HAYDEN UND SNYDER 1993; KRONEN *et al.* 1994; MURTHY *et al.* 2003). Um seine Wirkung komplett entfalten zu können, muss es jedoch zwei bis vier Wochen vor dem Eingriff appliziert werden (AVIADO UND DETTELBACH 1984). Die unmittelbare Wirkung nach Applikation soll jedoch ebenfalls Gegenstand des hier beschriebenen Forschungsvorhabens sein.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Studien über die Anwendung von diesen Medikamenten werden insbesondere zur Evaluation der Durchgängigkeit von Mikroanastomosen, weniger in Bezug auf die Verbesserung der Durchblutung, und damit der Vitalität des Gewebetransplantates im Ganzen durchgeführt. Diese Einschränkung auf die Beurteilung des Mikrogefäßes ist neben den extrem limitierten Vergleichsmöglichkeiten untereinander nicht auf das Transplantat übertragbar, sodass aktuell keine Studien existieren, die verschiedene Ansatzpunkte von Antikoagulanzen und Rheologika in Bezug auf den Lappenerfolg untersuchen. Ziel des hier durchgeführten Projektes ist es daher, die am effektivsten wirkenden Antikoagulanzen im Hinblick auf die Durchblutungssituation im Transplantat zu finden, und somit einer Thrombenbildung einem Gefäßspasmus in dem versorgenden Gefäßsystem in der bestmöglichen Weise vorzubeugen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tierart und Anzahl

Als Versuchstiere dienten 108 männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von je 300g.

2.1.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden von einem Züchter gekauft und im Zentrum für präklinische Forschung der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar untergebracht. Nach Lieferung der Ratten wurden diese gewogen und eine tierärztliche allgemein Untersuchung durchgeführt, um den aktuellen Gesundheitszustand festzustellen und eventuelle Schädigungen durch den Transport auszuschließen. Danach wurde den Ratten eine mindestens 14-tägige Eingewöhnungszeit gewährt. Der Verlauf des Körpergewichtes und des Gesundheitszustandes wurden weiterhin überwacht. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konventionellen Hygienebedingungen in Standardkäfigen aus Makrolon (für bis zu 2 Ratten Typ III (H: 20 cm, B: 22 cm, T: 37 cm); für bis zu 4 Ratten Typ IV (H: 20 cm, B: 35 cm, T: 55 cm). Futter (Rattenpellets Fa. Altromin) und Wasser erhielten die Tiere ad libitum (Trinkwasser bei Wechsel der Tränkeflaschen 2-3mal pro Woche). Den Tieren standen, neben normaler Holzgranulateinstreu, Kriechröhren aus rotem Kunststoff und Zellstoff als Nestbaumaterial zur Verfügung. Die Räume waren speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (Personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen. Das Hygienemanagement basierte auf der regelmäßigen, d.h. alle 3 Monate durchgeführte Untersuchung von Ratten, die längere Zeit in dem Rattenraum gehalten wurden. Die Untersuchungen wurden von einem externen qualitätszertifizierten Fachlabor durchgeführt. Der Betriebsablauf innerhalb des ZPF ist durch entsprechende Hygieneregeln definiert (Hygiene SOPs). Die Vorbereitung der Tiere auf den Versuch basierte auf der körperlichen Untersuchung der Tiere (Zustand, Gewicht, Reaktion auf Handling,

Artgerechtes Verhalten und Mimik). Die Tiere wurden in den Versuch integriert, sofern keinerlei Beanstandungen bestanden.

2.1.3 Gruppeneinteilung und Medikation

Jeweils eine Versuchsgruppe (verschiedene Medikamente, d.h. Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, unfraktioniertes Heparin, fraktioniertes Heparin, Hirudin, Dextran, Pentoxifyllin) wird mit der Kontrollgruppe verglichen, die keine medikamentöse Behandlung erhält und nur mittels gehobenem Lappentransplantat und anschließender orthotopen (d.h. wieder an gleicher Stelle) Replantation operiert wird. Die Fragestellung dieser Versuchsgruppe besteht darin, dass evaluiert werden soll welches Antikoagulanzen oder Rheologikum bei einem auf einem sogenannten Perforator, d.h. kleinste Hautgefäße, basierendem Transplantat den besten Effekt auf den Transplantationserfolg besitzt. Das Transplantat wird bei diesem Modell nicht von seinem Hauptgefäß, sondern von feinen, in die Haut einstrahlenden Gefäße versorgt (siehe Abbildung 13).

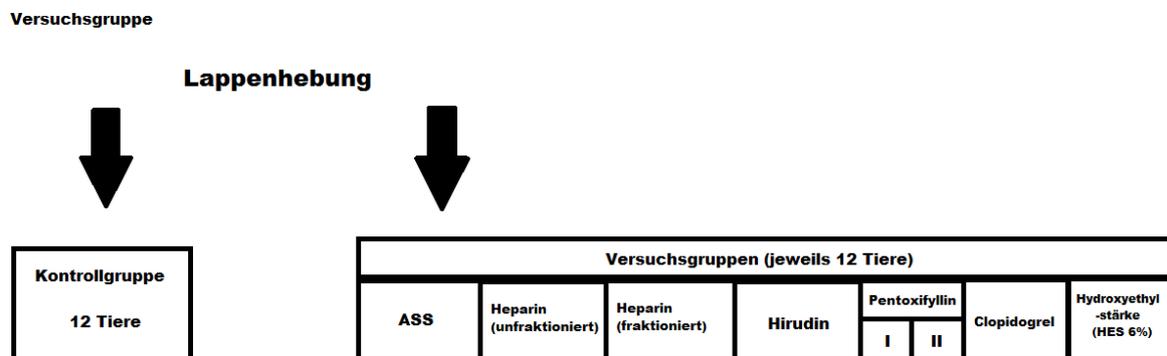


Abbildung 6: Gruppeneinteilung

Als Instrumente wurden standardisierte Operationsinstrument von Spingler & Tritt verwendet, die in Abbildung 6 und Tabelle 1 dargestellt werden.

Mikrochirurgisches Operationsinstrumentarium:

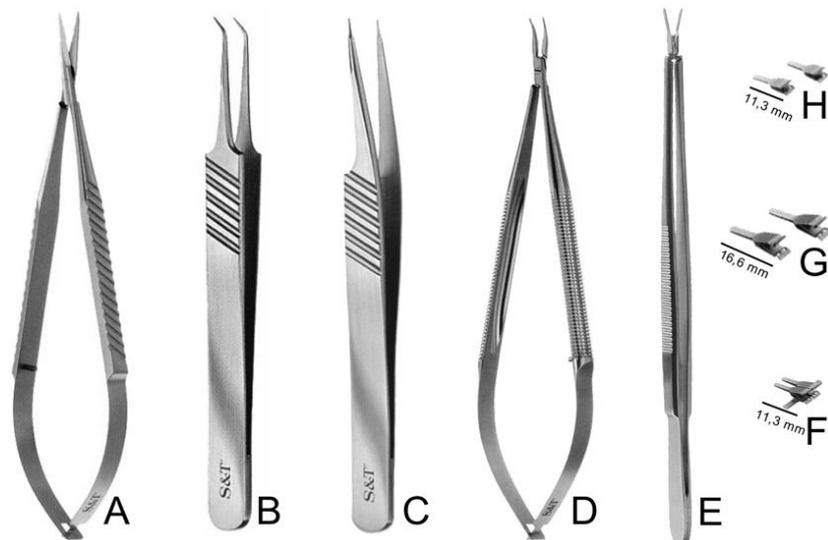


Abbildung 7: Darstellung von ausgewähltem mikrochirurgischem Operationsbesteck von Spingler und Tritt, S&T (Neuhausen, Schweiz).

A. Mikroschere SAS-15

B. Abgewinkelte Mikropinzette JFA-5b

C. Gefäßdilator D-5a

D. Nadelhalter B-13-8

E. Klemmenanlegepinzette CAF-4

F. Approximatorklemme ABB-22

G. Einzelklemmen B-3

H. Einzelklemmen B-2

Verwendetes Operationsbesteck von S&T (Neuhausen, Schweiz). Instrument	Bezeichnung
Nadelhalter, 13 cm lang, Rundgriff 8 mm, gebogen	B-13-8
Nadelhalter-Pinzette, 18 cm lang, Rundgriff 8 mm, gebogen	NHF-18 RM-8
Mikropinzette, 11 cm lang, Flachgriff 9 mm, abgewinkelt 10°	JFA-5b
Gefäßdilator, 11 cm lang, Flachgriff 9 mm, gerade	D-5a
Schere, Länge 15 cm, Flachgriff 8 mm, Klingen 19 mm, gerade	SAS-15
Schere, Länge 15 cm, Flachgriff 8 mm, Klingen 19 mm, gebogen	SDC-15
Pinzette, 11 cm lang, Flachgriff 9 mm, abgewinkelt 45°	JFA-5b
Pinzette, 18 cm lang, Rundgriff 8 mm, gebogen	FRC-18 RM-8
Klemmenanlegepinzette, 13 cm lang, Flachgriff 8 mm	CAF-4
Approximatorklemme, je 2 3,0 x 11,3 mm	ABB-22

Tabelle 1: Verwendetes Operationsbesteck

Zur Blutstillung und zur Säuberung der OP-Region nach Spülungen wurden verschiedene Tupfer verwendet (Telatrast Telaprep® No.1 klein, No. 450 100/1, Telatrast Telasling® No.2 walnussgroß, No. 451 103/6 jeweils von Hartmann (Heidenheim, Deutschland), um mögliche Einflussfaktoren durch Blutprodukte ausschließen zu können. Der Situs wurde diesbezüglich mit herkömmlicher Ringer - Lösung gespült.

4. Die Tiere werden nach Narkoseeinleitung auf einer über eine Rektalsonde automatisch regulierbare Wärmematte positioniert, wobei Atmung und Puls über ein Pulsoxymeter überwacht werden
5. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt mittels Ketamin 33 mg/kg Körpergewicht und Xylazin 1,6 mg/kg alle 30 Minuten unter permanenter Kontrolle der Vitalparameter über das durchgeführte Monitoring
6. Desinfektion des Op-Bereichs mit Cutasept®-Lösung

2.2.2 Dokumentation

Für die Dokumentation wird ein standardisiertes Protokoll erstellt. Vermerkt werden hier das Körpergewicht des Tieres, die OP-Zeiten, die Medikamentengruppe sowie der Zeitpunkt der Applikation und Dosierung des zu verabreichenden Antikoagulanz. Des Weiteren werden das Verhalten der Tiere im Verlauf und die Wundverhältnisse protokolliert.

Nach erfolgter initialer Narkose wird das Hautareal am Oberbauch mittels einer non-invasiven Durchblutungsmessung mit dem sog. O2C-Gerät untersucht. Zu den unten näher definierten Zeitpunkten erfolgt die Dokumentation der Änderung der Durchblutung bedingt durch den operativen Eingriff und der Einheilung durch die O2C-Messungen, planimetrische Erfassung von Nekrosezonen in mm² sowie die Berechnung in Prozent und die Fotodokumentation.

Diese Diagnostika werden vor sowie nach Hebung und nach Ablauf des siebten postoperativen Tages in tiefer Narkose erneut angewendet.

2.2.2.1 Messprinzipien/O2C-Messungen

Zur Erfassung sämtlicher Werte werden mit dem O2C-Gerät der Firma LEA-Medizintechnik mehrere Messungen durchgeführt. Die kombinierte Laser-doppler-Spektroskopie und Gewebespektrometrie ermöglicht die nicht-invasive lokale Tomografie der Durchblutungsverhältnisse eines Gewebes.



Abbildung 9: O2C-Gerät mit Bildschirm, Tastatur und Sonde (O2C Manual-LEA Medizintechnik)

Bei den O2C-Messungen werden Basisdaten über die individuelle Hämoglobinkonzentration, Hämoglobinoxygenierung des vor allem in den Venolen befindlichen Blutes (%), Blutfluss und die Blutflussgeschwindigkeit gemessen und als Referenzwerte für weitere Untersuchungen festgelegt. Die Technologie des O2C basiert auf zwei physikalischen Prinzipien. Zum einen die Weißlicht-Spektroskopie (manchmal auch Spektrometrie oder Reflektions-Spektroskopie genannt) und zum anderen das Laser-Doppler-Verfahren. Mit einer Sonde wird nicht-invasiv gleichzeitig Weißlicht (Wellenlänge von 500 bis 800 nm) und Laserlicht in das Gewebe eingebracht. Das Licht breitet sich diffus im Gewebe aus. Die Photonen werden im Gewebe in alle Richtungen gestreut. Einige dieser Photonen finden einen Weg zurück an die Gewebeoberfläche und werden von der integrierten Messsonde erfasst. Wenn das Weißlicht mit Erythrozyten wechselwirkt, wird ein Teil des Lichtspektrums absorbiert. Das Licht nimmt die Farbe des Hämoglobins an. Diese Farbe ist ein Maß für die Sauerstoffsättigung der Erythrozyten. Trifft das einfallende Laserlicht auf bewegte Erythrozyten, so erfährt dieses Licht eine Frequenzverschiebung (sog. Dopplerverschiebung). Die Dopplerverschiebung ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Erythrozyten. Die Summe aller Erythrozyten und deren Geschwindigkeit ist ein Maß für den Blutfluss im komplexen Kapillarnetz. Im Vergleich zur Ultraschallmessung ist es hier nicht notwendig, das Gefäß zu finden

und dessen Querschnittsfläche zu ermitteln. Es handelt sich bei den Messungen um ein nicht-invasives und schmerzfreies Verfahren. Die Parameter geben Aufschluss über die Gewebesituation und erlaubt dem Untersucher die Beurteilung der Vitalität an Hand verschiedener physiologischer Messparameter.

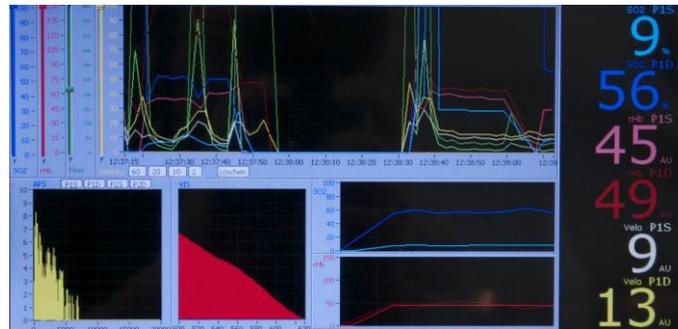


Abbildung 10: O2C-Messungen

Messfehler

Folgende Aspekte sollten bei der Messung beachtet werden, um die Fehlerquote zu minimieren:

- Jegliche externe Lichteinstrahlung wie OP-Leuchten oder Sonnenlicht sollte vermieden werden
- Patienten und Untersucher müssen soweit wie möglich unbeweglich bleiben
- Die Messungen sollten in physiologischer Ruhe (>10 Minuten Ruhe, entspannte Atmosphäre und Raumtemperatur) stattfinden
- Die Messung zwar mit Hautkontakt, aber ohne jeglichen Druck durchführen

2.2.2.2 Fotodokumentation und Image J

Die Fotodokumentation erfolgt mit Hilfe einer CCD-Kamera (Typ COOLPIX 8700, Nikon, Düsseldorf, Germany). Die Ausrichtung der Kamera liegt dabei rechtwinklig zum Transplantat.

Bei ImageJ handelt es sich um ein in Java geschriebenes Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm, das sich auf Bildformate wie TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS und RAW anwenden lässt. Das Programm erfasst mit Hilfe der

Pixelwerte die Größe der vom Benutzer ausgewählten Bereiche eines Bildes und kann Entfernungen und Winkel messen. Image J dient bei dem Versuch zur planimetrischen Erfassung der Nekrosezonen in mm^2 sowie deren Berechnung in Prozent.

2.2.3 Durchführung

2.2.3.1 OP-Vorbereitungen

Nach Einleitung der Anästhesie und Erreichen der chirurgischen Toleranz (III²) unter Kontrolle durch das oben aufgeführte Monitoringtechniken wird zunächst das Gewicht der Ratte bestimmt. Die Lappenregion wird mit Hilfe einer Schablone mit einer Länge von 7cm und einer Breite von 4cm auf das rasierte Abdomen eingezeichnet. Die Längsachse ist dabei parallel zur Körperachse des Tieres. Die Region erstreckt sich in der Länge von inguinal nach thorakal und ist in der Breite leicht mittellinienüberschreitend. Anschließend erfolgt die erste Messung mit dem O2C-Gerät im gekennzeichneten Areal.

2.2.3.2 Operation: Epigastrischer Perforanslappen

Zur Durchblutung des Lappentransplantates werden anstelle eines Gefäßstiels die sog. kleinen Perforansgefäße zur Durchblutung belassen. Hierbei orientiert sich das Vorgehen größtenteils an der Präparation des epigastrischen Lappens nach Strauch und Murray (STRAUCH UND MURRAY 1967). Das markierte Hautareal wird mit dem Skalpell scharf umschnitten und das Transplantat von der muskulären Unterlage abpräpariert. Hierbei ist darauf zu achten, dass die zarten Perforatorgefäße nicht traumatisiert oder durchtrennt werden. Blutungen werden mittels bipolaren Stroms koaguliert und gestillt. Inguinal werden A. und V. epigastrica inferior, die vor allem das subkutane Fettgewebe und die Haut der Leistenregion versorgen, so freigelegt, dass ihre Abzweigung aus den Femoralgefäßen optimal dargestellt ist. Der epigastrische Gefäßstiel wird ligiert oder mit einem Koagulationsgerät vom Typ ERBOTOM Modell ICC 350 von Erbe (Tübingen, Deutschland) kauterisiert.

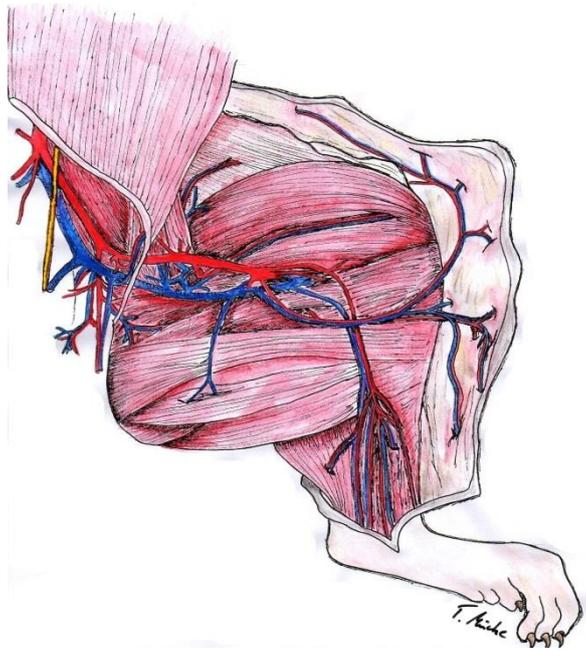


Abbildung 11: Darstellung der epigastrischen Gefäße bei der Ratte

Anders als bei STRAUCH und MURRAY (1967) findet bei diesem Versuch keine Reanastomosierung der epigastrischen Gefäße statt. Das Transplantat wird so durch die Perforansgefäße, die aus der Muskulatur in die Haut einstrahlen, durchblutet (Abbildung 13). Es bestehen meist drei bis vier Perforansgefäße, die dargestellt werden sollen und bis auf den zweiten Perforator durchtrennt werden, so dass die Perfusion schließlich nur noch durch ein einzelnes Perforatorgefäß gewährleistet ist. Die Perfusion wird mit dem O2C-Gerät nach der Lappenhebung erneut in Narkose dokumentiert.



Abbildung 12: Epigastrischer Lapen mit Gefäßstiel an der Ratte



Abbildung 13: Dargestellt sind die Perforatoren (schwarze Pfeile), die die darüber sichtbare epigastrische Haut mit Blut versorgen

Vor Beginn der Hebung des Transplantates wird entsprechend dem Versuchsprotokoll die antikoagulative Medikation verabreicht. Die Applikation der Antikoagulanzen erfolgt bei ASS (25 mg/kg KG alle 24 Stunden), Hydroxyethylstärke (HES 6%, Voluven®) (7,5ml/kg KG alle 12 Stunden), Pentoxifyllin (1,5 mg alle 24 Stunden) erfolgt intraperitoneal, Clopidogrel (1 mg oral alle 24 Stunden via Knopfsonde) oral, unfraktioniertes Heparin (100 I.E./kg KG alle 8 Stunden) fraktioniertes Heparin (100 Xa I.E. alle 12 Stunden) und Hirudin (0,25 mg/kg KG alle

8 Stunden) wird bei den Tieren subkutan appliziert. Nach Hebung des Gewebetransplantates wird das Hautareal wieder replantiert und zirkulär in den ursprünglichen Defektbereich epigastrisch eingenäht, so dass die Hautoberfläche wieder hergestellt ist. Dafür werden monofile Fäden der Stärke 6-0 (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt, Germany) verwendet. Nach Wiedererwachen der Tiere werden diese in den Käfig gesetzt und anschließend täglich dreimal in Abständen von acht Stunden visitiert.

	ASS	Clopidogrel	Pentoxifyllin	HES	Heparin	Clexane	Hirudin
0h	25mg/kgKG	4,5mg/kgKG	4,5mg/kgKG	7,5ml/kgKG	100IE/kgKG	100IE/kgKG	0,25mg/kgKG
4h							
8h					100IE/kgKG		0,25mg/kgKG
12h				7,5ml/kgKG		100IE/kgKG	
16h					100IE/kgKG		0,25mg/kgKG

Tabelle 2: Medikationsschema

2.2.4 Explantation und Euthanasie der Tiere

Sieben Tage postoperativ enden die Versuche. Direkt nach Beendigung werden die Tiere in tiefer Narkose (Isofluran) mittels Pentobarbital 60mg/kg intrakardial (Narcoren®, Fa. Rhone-Merieux GmbH, Laupheim) euthanasiert. Die Lappentransplantate werden nach erfolgter Euthanasie der Tiere für weitere immunhistochemische Analysen der Angiogenese und Gefäßstruktur im Transplantat entnommen.

2.2.5 Datenverarbeitung

Zur Datenverarbeitung dienen die im O2C-Gerät intern gespeicherten Messwerte für epidemiologische Daten. Für die statistische Analyse werden das Statistikprogramm "Statistical Package for the Social Sciences" (IMB SPSS für Mac, release 18.0.0. 2010, SPSS Inc, Chicago IL, USA) und Microsoft® Excel® für Mac 2011 benutzt. Für die Textverarbeitung wird das Programm Microsoft® Word® für Windows 7 verwendet. Eine multiple lineare Regressionsanalyse wird verwendet, um Faktoren,

wie z.B perioperativ gemessene Daten und das verwendete Antikoagulanz, die mit einem Lappenverlust oder einer Revision assoziiert sein könnten, zu spezifizieren. Die Werte werden entsprechend anhand der gemessenen Parameter (Hämoglobin-oxygenierung, Hämoglobinkonzentration, Blutfluss und Blutgeschwindigkeit jeweils in 2 mm und 8 mm Tiefe) analysiert und je nach verwendetem Antikoagulanz mit einem linear-gemischten Modell verglichen.

3 Ergebnisse:

Insgesamt wurden in dieser experimentellen Arbeit 108 männliche Wistar-Ratten verwendet. Das mittlere Gewicht der Tiere betrug 300g. Je zwölf Tiere wurden einer Versuchsgruppe bzw. der Kontrollgruppe zugeordnet. Die mittlere Operationsdauer belief sich auf 43 Minuten. Bei der Lappenhebung zeigten sich keine Komplikationen. In der Kontrollgruppe wurde eine mittlere Vitalitätsrate von 8,6% beobachtet. Die mittleren Vitalitätsraten für die jeweiligen Kontrollgruppen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Verglichen mit der Kontrollgruppe wiesen alle Versuchsgruppen außer der Gruppe, bei der erst am OP-Tag die Therapie mit Pentoxifyllin begonnen wurde, einen signifikant größeren Anteil von vitalem Lappenanteil auf (Tabelle 4).

Medikament	Mittlere Vitalitätsrate in %
ASS	38,1
Pentoxifyllin am OP-Tag (1)	23,9
Pentoxifyllin 2 Wochen präoperativ (2)	46,2
Clopidogrel	63,5
HES	25,8
Heparin	21,2
Clexane	36,7
Lepirudin	58,0
Kontrolle (NaCl 0,9%)	8,6

Tabelle 3: mittlere Vitalitätsrate

Nachfolgend werden exemplarisch die verschiedenen Gewebetransplantate der jeweiligen Gruppen dargestellt. Neben der resultierenden Überlebensrate zeigten

sich bei den jeweiligen Gewebetransplantaten verschiedene, wiederholt beobachtete Komplikationen, die im Rahmen der Versuche typisch für die jeweilige verwendete Substanz zu sein schien.

ASS



Pentoxifyllin (1)



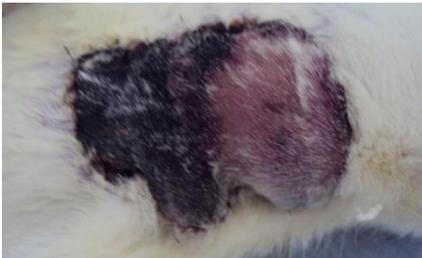
Pentoxifyllin (2)



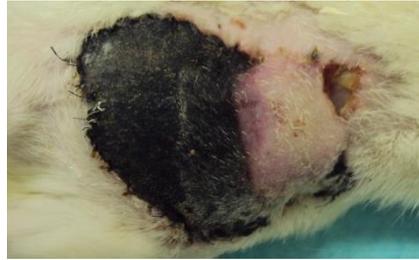
Clopidogrel



HES



Heparin



Clexane



Lepirudin



Kontrolle (NaCl)



Abbildung 14: Epigastrische Perforanslappen (repräsentative Auswahl) der einzelnen Versuchsgruppen am Explantationsdatum

Bei der Verwendung von HES zeigte sich in 10 von 12 Gewebetransplantaten eine starke ödematöse Schwellung und Auftreibung unterhalb des Transplantates. Die Transplantate wiesen zunächst bis zum vierten Tag eine livide Schwellung und tief bläuliche Verfärbung auf. Entsprechend dem dargestellten Beispielbild zeigte sich dann im Verlauf eine entsprechende Demarkierung des nekrotischen Areals, während der vitale Anteil seine tiefbläuliche Farbe beibehielt, jedoch vital blieb. Bei den Gewebetransplantaten, welche mit Heparin behandelt wurden zeigte sich häufiger eine Serombildung unter den nekrotischen Gewebetransplantatanteilen, dies zeigte sich in 7 von 12 Transplantaten. Bei Lepirudin konnte in 4 von 12 Fällen eine leichte Einblutung in die Haut des Gewebetransplantats beobachtet werden. Bei

der Anwendung der anderen Antikoagulanzen zeigten sich keine besonderen oder typischen Auffälligkeiten.

In der Auswertung der verschiedenen Gewebetransplantate zeigten sich zwischen den verschiedenen Gruppen unterschiedliche Überlebensquoten in den Hautlappen. Die höchsten Vitalitätsraten zeigen Clopidogrel mit 63,5% und Lepirudin mit 58%. Die Ergebnisse sind gegenüber der Kontrolle sowie den Medikamentengruppen HES, Heparin und Pentoxifyllin (1) signifikant unterschiedlich (Tabelle 5). Lepirudin zeigt zusätzlich gegenüber ASS eine signifikant höhere Vitalitätsrate. Im Boxplot (Abbildung 14) ist erkennbar, dass die Vitalitätsraten in der Versuchsgruppe, die zur Antikoagulation Clopidogrel erhalten hat, zwar zum großen Teil sehr hoch sind, allerdings auch stark variieren.

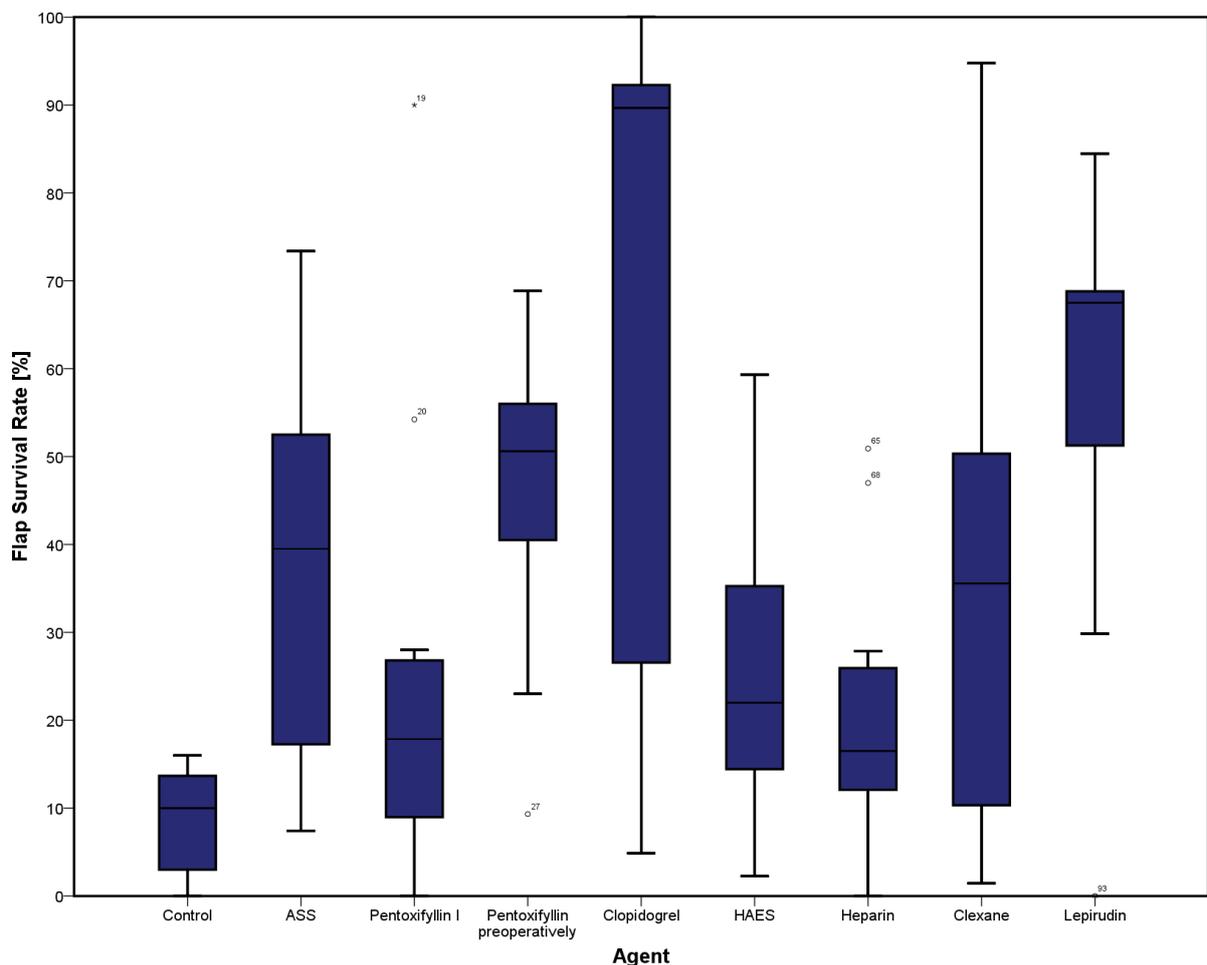


Abbildung 15: Boxplot der Vitalitätsraten der verschiedenen Medikamentengruppen

Medikament	Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (p-Wert)
ASS	0,000
Pentoxifyllin (1)	0,057
Pentoxifyllin (2)	0,000
Clopidogrel	0,000
HES	0,003
Heparin	0,013
Clexane	0,004
Lepirudin	0,000

Tabelle 4: p-Werte der einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe bezogen auf die Vitalitätsrate

In der nachfolgenden Tabelle zeigen sich die unterschiedlichen Nekroseraten der einzelnen Gruppen in der Gegenüberstellung im Vergleich in Abhängigkeit zu den jeweiligen Behandlungsprotokollen. Hierbei zeigen sich die einzelnen p-Werte der jeweiligen Versuchsgruppen in der Gegenüberstellung.

	ASS	Pentoxifyllin (1)	Pentoxifyllin (2)	Clopidogrel	HAES	Heparin	Clexane	Lepirudin
ASS	-	0,160	0,322	0,058	0,138	0,039	0,898	0,042
Pentoxifyllin(1)	0,160	-	0,019	0,007	0,828	0,753	0,265	0,002
Pentoxifyllin(2)	0,322	0,019	-	0,164	0,007	0,001	0,340	0,164
Clopidogrel	0,058	0,007	0,164	-	0,005	0,002	0,066	0,673
HES	0,138	0,828	0,007	0,005	-	0,477	0,273	0,001
Heparin	0,039	0,753	0,001	0,002	0,477	-	0,115	0,000
Clexane	0,898	0,265	0,340	0,066	0,273	0,115	-	0,060
Lepirudin	0,042	0,002	0,164	0,673	0,001	0,000	0,060	-

Tabelle 5: p-Werte der einzelnen Versuchsgruppen gegeneinander bezogen auf die Vitalitätsrate

In der logistischen Regressionsanalyse zeigten sich sowohl in der linearen als auch in der multiplen Testung die Einflussfaktoren Clopidogrel und Lepirudin gegenüber

der Gesamtgruppe als signifikant positive Einflussfaktoren auf die Vitalität des Gewebetransplantates. Als besonders effektiv und hochsignifikant zeigte sich hier das verwendete Clopidogrel (p=0,001).

	p-Wert	Hazard-Ratio	95%- Konfidenzintervall
Clopidogrel	0,001	1,040	1,016-1,065
Lepirudin	0,006	1,031	1,009-1,054

Tabelle 6: Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse für Clopidogrel und Lepirudin

O2C-Messungen:

Durch das O2C-Gerät wurden die Hämoglobinoxygenierung, die Hämoglobinkonzentration, der Blutflusses und die Flussgeschwindigkeit prä- sowie postoperativ und am Explantationstag gemessen. In fast allen Versuchsgruppen erreichte die präoperativ gemessene Hämoglobinoxygenierung einen ähnlichen Wert von ca. 38. In der Lepirudingruppe betrug die Hämoglobinoxygenierung präoperativ 138, in der Kontrollgruppe 7. Postoperativ fiel die Hämoglobinoxygenierung in allen Gruppen mit Werten um 20 stark ab. Am Tag der Explantation unterschieden sich die Werte für die Hämoglobinkonzentration in den Gruppen nicht deutlich von den postoperativen Messungen. In der Kontrollgruppe war aufgrund einer totalen Nekrose keine Messung möglich.

Medikament	SpO2Prä	SpO2Post	SpO2Explant
ASS	37	8	4
Pentoxifyllin (1)	38	9	17
Pentoxifyllin (2)	39	14	18
Clopidogrel	40	11	22
HES	38	10	20
Heparin	35	10	23
Clexane	41	22	21
Lepirudin	138	25	11
Kontrolle	7	2	-

Tabelle 7: Gemessene O2C-Werte für die Hämoglobinoxygenierung im Verlauf

Die präoperativ gemessenen Werte für die Hämoglobinkonzentration lagen in allen Versuchsgruppen bei ca. 58. In der Kontrollgruppe wurde ein Wert von 50 erreicht. Postoperativ stiegen die Werte in allen Gruppen um ca. 10 Einheiten an. Am Explantationstag fielen die Werte für die Hämoglobinkonzentration in den meisten Gruppen wieder, erreichten aber nicht immer den Ausgangswert der präoperativen Messung. In der ASS-Gruppe sank die Hämoglobinkonzentration jedoch von 53 präoperativ auf 34 am Explantationstag. In der Lepirudin-Gruppe stieg der gemessene Wert für die Hämoglobinkonzentration von 56 präoperativ über 74 postoperativ auf 79 am Explantationstag. In der Kontrollgruppe war aufgrund einer totalen Nekrose keine Messung möglich.

Medikament	rHbPrä	rHbPost	rHbExplant
ASS	53	73	34
Pentoxifyllin (1)	62	76	58
Pentoxifyllin (2)	58	76	57
Clopidogrel	59	71	59
HES	56	69	57
Heparin	59	79	69
Clexane	61	84	69
Lepirudin	56	74	79
Kontrolle	50	63	-

Tabelle 8: Gemessene O2C-Werte für die Hämoglobinkonzentration im Verlauf

Die Messergebnisse zum Verhalten des Blutflusses sind sehr heterogen.

Unter ASS bestand initial ein Fluss von 123, der postoperativ konstant blieb (125). Am Tag der Explantation sank der Fluss auf 83. In der Pentoxifyllin (1) - Gruppe herrschte präoperativ ein Fluss von 162, welcher nach der Operation auf 111 abfiel. Am Explantationstag stieg der Fluss wieder auf 147 an. Bei einer Applikation von Pentoxifyllin bereits 14 Tage präoperativ (Pentoxifyllin (2)) wurde präoperativ ein Fluss von 140 gemessen. Postoperativ zeigten die Messungen mit 138 einen annähernden Wert. Ein Abfall des Flusses auf 81 wurde am Explantationstag gemessen. In der Clopidogrel-Gruppe wurde präoperativ ein Fluss von 157 gemessen, der postoperativ auf einen Wert von 113 abfiel. Der Fluss hielt sich bis zum Explantationstag mit einem Wert von 108 relativ konstant. Bei Gabe von HES

betrug der initiale Fluss 151. Bei einem Anstieg postoperative auf 166 sank der Fluss im Verlauf auf 76 am Tag der Explantation. Unter Heparin-Therapie sank der Fluss im Verlauf von 158, gemessen vor der Operation auf einen Wert von 86 postoperativ und auf 67 am Explantationstag. In der Clexane-Gruppe herrschte präoperativ ein Fluss von 183, welcher nach der Operation auf 122 abfiel. Am Explantationstag war der Fluss weiter auf 95 gesunken. Unter Therapie mit Lepirudin bestand initial ein Fluss von 122, der postoperativ auf 83 abfiel. Am Tag der Explantation sank der Fluss auf 5. In der Kontrollgruppe wurde präoperativ ein Fluss von 102 gemessen. Postoperativ bestand ein Anstieg des Flusses auf 123. In der Kontrollgruppe war aufgrund einer totalen Nekrose am Explantationstag keine Messung möglich.

Medikament	FlowPrä	FlowPost	FlowExplant
ASS	123	125	83
Pentoxifyllin (1)	162	111	147
Pentoxifyllin (2)	140	138	81
Clopidogrel	157	113	108
HES	151	166	76
Heparin	158	86	67
Clexane	183	122	95
Lepirudin	122	83	5
Kontrolle	102	123	-

Tabelle 9: Gemessene O2C-Werte für den Blutfluss im Verlauf

Die Werte für die Flussgeschwindigkeit (Velocity) unterscheiden sich in den präoperativen, postoperativen Messungen und den Messungen am Explantationstag nicht stark voneinander. Sie liegen gemittelt etwa bei 20. Im Verlauf sinkt in der Lepirudin-Gruppe die Flussgeschwindigkeit auf 6.

Medikament	VelocityPrä	VelocityPost	VelocityExplant
ASS	20	20	26
Pentoxifyllin (1)	24	21	24
Pentoxifyllin (2)	23	23	19
Clopidogrel	24	20	21
HES	26	24	17
Heparin	24	18	15
Clexane	26	24	17
Lepirudin	22	17	6
Kontrolle	18	23	-

Tabelle 10: Gemessene O2C-Werte für die Blutflussgeschwindigkeit im Verlauf

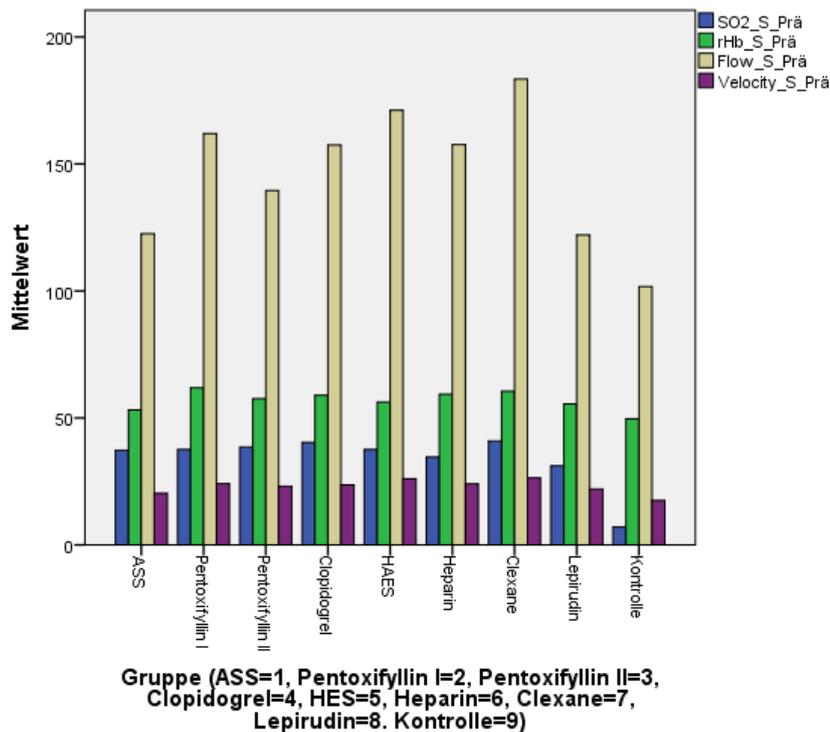


Abbildung 16: Darstellung der Mittelwerte von präoperativer Hämoglobinoxygenierung, Hämoglobinkonzentration, Blutfluss und Flussgeschwindigkeit

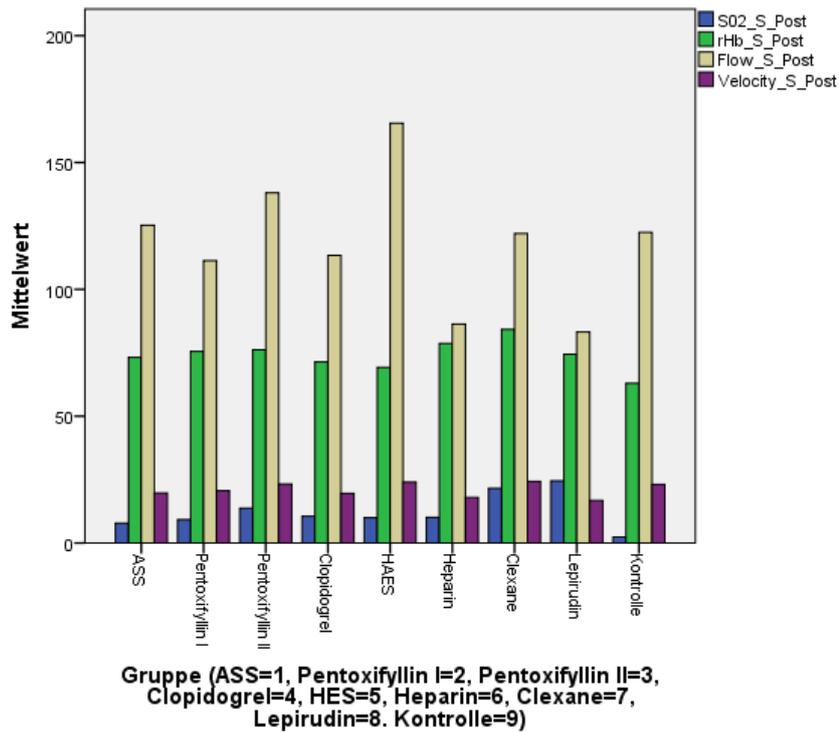


Abbildung 17: Darstellung der Mittelwerte von postoperativer Hämoglobinoxygenierung, Hämoglobinkonzentration, Blutfluss und Flussgeschwindigkeit

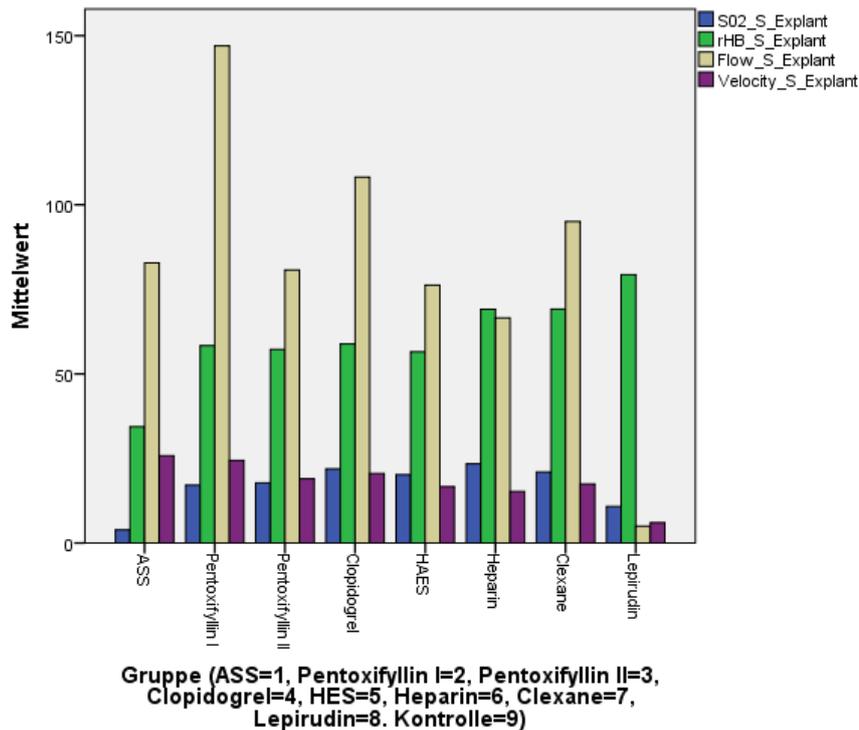


Abbildung 18: Darstellung der Mittelwerte von Hämoglobinoxygenierung, Hämoglobinkonzentration, Blutfluss und Flussgeschwindigkeit am Explantationstag

4 Diskussion

Die Frage nach der bestmöglichen antikoagulativen Therapie in der rekonstruktiven Mikrochirurgie ist nach wie vor aktuell. Ziel dieser Therapie ist es, die Thrombosierungsrate der Anschlussgefäße so gering wie möglich zu halten und die Fließeigenschaften des Blutes innerhalb des Gewebetransplantates zu verbessern. Eine optimale Perfusion und somit eine solide und rasche Einheilung des Transplantates soll dadurch gewährleistet, dass Komplikationen und Verlusten minimiert werden.

Diverse Konzepte der supportiven Antikoagulation bei mikrochirurgischem Gewebetransfer werden sowohl in tierexperimentellen wie auch in klinischen Studien beschrieben. Bei den klinischen Arbeiten handelt es sich in der Regel um retrospektive Studien. Bislang gibt es nur eine prospektive Studie zum Thema der antikoagulativen Therapie in der rekonstruktiven Mikrochirurgie von KHOURI *et al.* (2001). Auch bei den tierexperimentellen Studien sind die Konzepte zur Durchführung teilweise heterogen.

Vor allem bei den tierexperimentellen Studien wird der Fokus verstärkt auf die mögliche Thrombosierung der Anastomose gelegt. Hier erfolgt eine Durchtrennung und Reanastomosierung der versorgenden Gefäße und die anschließende Beobachtung des anastomosierten Bereiches auf Thrombenbildung. Häufig wird diese sogar noch durch bestimmte Methoden (Tuck-Modell oder Avulsion-Injury-Modell) (COOLEY UND HANSEN 1985; STEPNIK *et al.* 1994) provoziert. In selteneren Fällen wird die Perfusion am nicht-anastomosierten Gefäßstiel untersucht. Die Verödung kollateral bestehender Versorgungsgefäße macht eine höhere Flussrate in der als Gefäßstiel dienenden Arterie notwendig, um eine ausreichende Perfusion zu gewährleisten. Zusätzlich zur antithrombotischen Wirkung kann eine mögliche rheologische Eigenschaft von Antikoagulanzen durch die Herabsetzung der Blutviskosität den Blutfluss zusätzlich fördern (SCHMID-SCHONBEIN 1981; TRUBESTEIN *et al.* 1981; AVIADO UND DETTELBACH 1984; REICH *et al.* 1984; DETTELBACH UND AVIADO 1985; SALEMAR *et al.* 1991; SALEMAR *et al.* 1995).

Während die meisten bisherigen Studien die Durchgängigkeit der Mikroanastomose nach Antikoagulanzen-Gabe evaluieren, fokussiert sich diese Arbeit insbesondere auf die Verbesserung der Durchblutung und damit der Vitalität des Gewebetransplantates. In der Tat konnten hier durch fast alle Medikamente signifikante Verbesserungen in der Perfusion des Transplantates erzielt und die nekrotische Areale in dem verwendeten überdimensionierten Gewebetransplantat minimiert werden.

Generell besteht bislang kein einheitliches therapeutisches Konzept bezüglich der Verwendung von Antikoagulanzen. Die Auswahl sowie die Kombinationen verschiedener Antikoagulanzen erweisen sich als relevante Einflussfaktoren bei der Verbesserung der Durchblutungssituation mikrochirurgischer Transplantate. Auch die Art der Applikation (systemisch oder lokal) und der Zeitpunkt bzw. die Zeitspanne der Therapie (peri-, intra- oder postoperativ) beeinflussen das Outcome.

4.1 ASS

Acetylsalicylsäure (ASS), auch Aspirin, ist der am häufigsten verwendete Plättchenaggregationshemmer. Durch die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase wird die Hemmung der Thromboxanbildung die Plättchenaktivierung und -funktion herabgesetzt. Daher wirkt es bei einem durchschnittlichen

Erwachsenen von etwa 70kg bereits in einer Dosis von 50-100mg/Tag antikoagulativ. Über die Synthesehemmung von Prostaglandinen wirkt ASS in höheren Dosen außerdem antipyretisch, analgetisch (0,5-1g/Tag) und antirheumatisch (1-5g/Tag). Anwendung findet ASS insbesondere im Bereich der Kardiologie zur Behandlung der koronaren Gefäßerkrankung. Es findet auch prophylaktische und therapeutische Anwendung in der rekonstruktiven Mikrochirurgie und vor allem auch in der Neurochirurgie nach mikrochirurgischen Eingriffen (CHIEN *et al.* 2005). ASS weist in unseren Untersuchungen mit einer mittleren Vitalitätsrate von 38,1% eine signifikante Verbesserung der Perfusion im Vergleich zur Kontrolle auf ($p=0,0001$). Dennoch zeigte sich verglichen mit den anderen Antikoagulanzen und Rheologika nur im Vergleich mit Heparin (mittlere Vitalitätsrate 21,3%) eine signifikante Verbesserung ($p=0,039$). Die von uns ausgewählte Medikamentendosierung betrug für ASS 25mg/kg Körpergewicht. Umgerechnet auf das durchschnittliche Gewicht einer Wistar-Ratte entspricht dies etwa 7,5mg in 24 Stunden. Bei einem erwachsenen Menschen mit einem Körpergewicht von etwa 70kg läge die entsprechende Dosis bei 1,75g am Tag. Ein antiinflammatorischer Effekt könnte also zusätzlich zu einer verbesserten Einheilung des Transplantates geführt haben.

SHALOM *et al.* (2008) untersuchen an 100 Wistar-Ratten die Wirkung von Aspirin und Heparin auf die Perfusion eines Random Skin Flap. Die Dosierung von Aspirin wurde dabei zwischen den Versuchsgruppen variiert: zum einen hochdosiert 200mg/kg Körpergewicht pro Tag, zum anderen niedrig dosiert 40mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die erste intramuskuläre Injektion erfolgte dabei 48 vor der Lappenhebung. Heparin wurde einer dritten Versuchsgruppe in einer Dosierung von 100 μ g/kg Körpergewicht zehn Minuten präoperativ intravenös verabreicht. Eine Erhaltungsdosis von 30 μ g/kg Körpergewicht schloss sich postoperativ an. Die vierte Versuchsgruppe erhielt hochdosiert ASS kombiniert mit dem oben genannten Heparin-Schema. Ein 8x2cm großer abdominal gelegener Hautlappen wurde gehoben und anschließend wieder in sein Bett eingenäht. Eine Anastomosierung ist nicht beschrieben. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte am siebten postoperativen Tag nur für hochdosiertes Aspirin ein signifikant positiver Effekt auf das Transplantatüberleben nachgewiesen werden.

SHALOM *et al.* (2008) konnten nur für hochdosiertes ASS (200mg/kg Körpergewicht) eine signifikante Verbesserung des Transplantatüberlebens nachweisen. Das vitale Areal betrug dabei etwa 75% der Gesamtfläche. Die Dosierung entspricht allerdings dem 8-fachen der in unseren Versuchen verwendeten Dosis von ASS (25mg/kg Körpergewicht). Auf einen Menschen von 70kg umgerechnet entspräche die einer Dosierung von 14g/Tag und würde höchstwahrscheinlich das Risiko für gastrointestinale Blutungen und auch renale Komplikationen erhöhen. In der niedrigdosierten ASS-Gruppe macht die vitale Fläche noch ca. 50% aus. Auch hier ist die von SHALOM *et al.* (2008) verwendete niedrigere Dosierungsvariante (40mg/kg Körpergewicht) noch 1,6fach höher gewählt als in unseren Versuchen. Selbst in der Kontrollgruppe betrug die Vitalitätsrate bei SHALOM *et al.* (2008) noch etwa 50%. Dieser Wert spiegelt eine, im Vergleich zu unseren Versuchen, hohe Perfusionsrate wieder. Es ist davon auszugehen, dass im Versuch von SHALOM *et al.* (2008) bereits auch ohne Antikoagulation eine bessere Ausgangsperfusion besteht. Eine Verbesserung der Perfusion ist daher möglicherweise erst bei einer schlechteren Ausgangssituation erkennbar. Dadurch ließe sich gegebenenfalls auch erklären weshalb in unseren Versuchen bereits eine Dosierung von ASS 25mg/kg Körpergewicht eine signifikante Verbesserung der Einheilungsrate erzielt.

4.2 Clopidogrel

Clopidogrel ist wie Acetylsalicylsäure ein Inhibitor der Plättchenaggregation. Die hemmende Wirkung entfaltet der ADP-Rezeptorantagonist durch Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors. Clopidogrel wird ebenfalls bevorzugt in der Therapie kardiovaskulär erkrankter Patienten verwendet. Teilweise in Kombination mit Aspirin, teilweise als Ersatz für Aspirin bei Unverträglichkeit. Zweck der Therapie bei zum Beispiel akuten ST-Hebungsinfarkten ist die Wiederherstellung der koronaren Perfusion. Auftretende Komplikationen sind Restenosierung und das so genannte Low-Flow- bzw. No-Flow-Phänomen. Selbst nach erfolgreicher perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) kommt es zu verminderter oder sogar fehlender Myokardperfusion (ITO *et al.* 1996; VAN 'T HOF *et al.* 1997). Der Einsatz von Clopidogrel und ASS kann dabei fördernd auf die koronare Perfusion wirken. Ein ähnlicher Effekt auf mikrovaskuläre Transplantate wäre denkbar und wünschenswert und konnte im Rahmen der hier präsentierten Studie auch nachgewiesen werden.

Clopidogrel zeigte in unserer Arbeit die beste Wirkung auf die Gewebepерfusion. Die Vitalitätsrate liegt in dieser Versuchsgruppe bei 63,5% und unterscheidet sich gegenüber den weiteren Gruppen mit Heparin, HES und Pentoxifyllin 1 signifikant. In der logistischen Regressionsanalyse zeigte Clopidogrel den stärksten Effekt auf die Durchblutungsverbesserung mit der resultierenden geringsten Nekroserate.

Am Beispiel der V. femoralis einer Ratte untersuchen MOORE und DESCHLER (2007) die antithrombogene Wirkung von Clopidogrel. Hierzu wurde 20 männlichen Sasco Sprague-Dawley Ratten zwei Stunden präoperativ 5mg/kg Körpergewicht Clopidogrel über eine Magensonde zugeführt. Die Kontrollgruppe, ebenfalls bestehend aus 20 Tieren, erhielt Kochsalzlösung. Die Femoralvene wurde nicht völlig durchtrennt, sondern in mikrochirurgischer Technik im 180 Grad-Winkel inzidiert und anschließend mit der „Tuck“-Methode nach STEPNIK *et al.* (1994) so genäht, dass ein überstehender Teil der Gefäßwand in das Lumen hinein ragt und somit als thrombogener Faktor fungiert. Anschließend wurde zusätzlich die Blutungszeit bestimmt und das Gefäß drei Stunden lang auf Thrombosierung beobachtet. Zur Beobachtung diente die Milking-Methode (ACLAND 1977), bei der das Gefäß distal der Anastomose mit einer Pinzette blutleer ausgestrichen wird. Bei anschließender Füllung kann eine Thrombosierung ausgeschlossen werden. Bei fehlender Füllung direkt nach Lösen der Approximatorklemmen wurde der Versuch als ungültig erklärt. Die Thromboserate in der mit Clopidogrel behandelten Gruppe betrug 7,9%, in der Kontrollgruppe 31,4% ($p < 0,025$). Die durchschnittliche Zeit bis zur Thrombosierung betrug in der Clopidogrelgruppe 2 Stunden (± 1) und in der Kontrollgruppe 1,27 Stunden ($\pm 0,47$). Die Blutungszeit war in der Clopidogrelgruppe deutlich verlängert (250 ± 100 Sekunden vs. 173 ± 59).

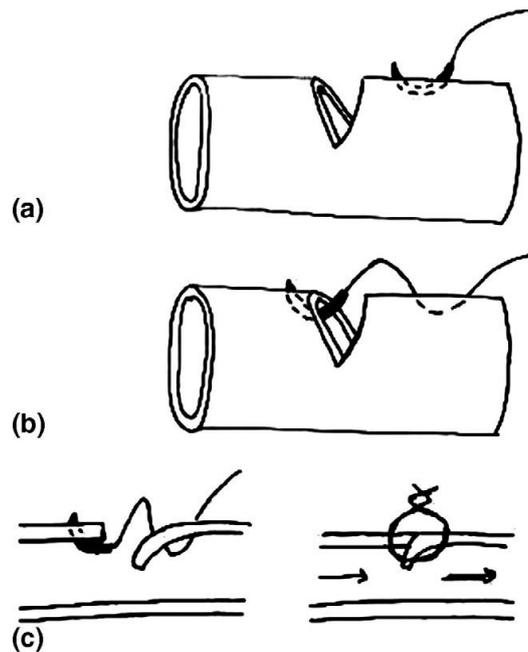


Abbildung 19: Tuck-Methode (MOORE UND DESCHLER 2007)

Auch NAYAK und DESCHLER (2005) verwenden die Tuck-Methode, um die antikoagulative Wirksamkeit von Clopidogrel an männlichen Sprague Dawley Ratten zu testen. Die Applikation von 5mg/kg KG Clopidogrel in der Versuchsgruppe bzw. Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe erfolgte zwei Stunden präoperativ über eine Magensonde. Anders als bei MOORE und DESCHLER (2007) erfolgte die Anastomose bei NAYAK und DESCHLER (2005) an der Arteria femoralis. Zusätzlich wurde zur Minderung von Vasospasmen lokal Lidocain 1% appliziert. Auch hier wurde die Blutungszeit bestimmt und das Gefäß mit Hilfe der Milking-Methode für drei Stunden nach Anastomosierung auf Thrombenbildung beobachtet.

Die Durchgängigkeit der A. femoralis war bei der Versuchsgruppe mit Clopidogrel in 81% gegeben, während die in der Kontrollgruppe nur 42% der anastomosierten Gefäße durchgängig waren. Der Unterschied war signifikant unterschiedlich ($p=0,01$). Die Blutungszeit war bei Clopidogrel signifikant verlängert (233 ± 48 vs. 158 ± 44).

YANG *et al.* (2006) überprüfen anhand von 40 Minischweinen die Wirkung von ASS und Clopidogrel kombiniert, sowie Tirofiban auf die koronare Perfusion. Die Applikation der Medikamente erfolgte in der ASS-Clopidogrel-Gruppe drei Tage präoperativ mit einer Initialdosis von 300mg Clopidogrel an die sich eine Erhaltungsdosis von 75mg/Tag anschloss sowie eine tägliche Gabe von Aspirin 10mg/kg Körpergewicht. In der Tirofiban-Gruppe wurde eine halbe Stunde

präoperativ ein Tirofiban-Bolus von 15µg/kg Körpergewicht intravenös appliziert, gefolgt von einer kontinuierlichen Gabe mit einer Infusionsrate von 0,3µg/kg Körpergewicht pro Minute. Die Kontrollgruppe erhielt nach demselben Schema eine intravenös applizierte Kochsalzlösung. Durch Okkludierung des Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde anschließend eine drei Stunden lange Ischämie erzeugt, gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusion.

Die Blutuntersuchungen ergaben eine signifikant herabgesetzte Koagulabilität in beiden Versuchsgruppen. Allerdings konnte nur in der Tirofiban-Gruppe eine verbesserte Perfusion festgestellt werden. Die gemessenen Nekrosezonen waren in dieser Gruppe signifikant kleiner und der koronare Blutfluss signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die kombinierte Gabe von ASS und Clopidogrel hingegen zeigte in beiden Kategorien keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz zur Behandlung mit Tirofiban war die Nekrosezone jedoch signifikant größer und der koronare Flow signifikant vermindert.

Die oben aufgeführten Studien untermauern die effektive antithrombotische Wirkung von Clopidogrel. In den Untersuchungen von MOORE und DESCHLER (2007) und NAYAK und DESCHLER (2005) wird als Kriterium jedoch nur die Durchgängigkeit der Anastomose herangezogen und nicht das Outcome der durch das Gefäß versorgten Region. Damit wird eine eventuelle rheologische Wirksamkeit von Clopidogrel komplett außer Acht gelassen. Die verwendeten Dosierungen von 5mg/kg Körpergewicht entsprechen in etwa der von uns verwendeten Dosis von 4,5mg/kg Körpergewicht pro Tag.

In den Versuchen von YANG *et al.* (2006) gilt die Perfusion des Myokards als Hauptkriterium. Beurteilt wurden hier die Größe des nekrotischen Areals sowie der per Echokardiographie gemessene koronare Blutfluss. Die Studie konnte in der Behandlung mit Clopidogrel keinen positiven Effekt auf die Myokardperfusion nachweisen. Das hier durchgeführte Applikationsschema unterscheidet sich von den Schemata anderer Autoren (NAYAK UND DESCHLER 2005; MOORE UND DESCHLER 2007) sowie auch dem unseren insofern, dass hier eine recht hohe Initialdosis mit einer anschließend geringen Erhaltungsdosis gewählt werden. Die Initialdosis entspricht bei einem mittleren Gewicht der verwendeten Minischweine von etwa 30kg 10mg/kg Körpergewicht. Die Erhaltungsdosis von 75mg beträgt umgerechnet 2,5mg/kg Körpergewicht. Während die hier gewählte Initialdosis also dem doppelten der von

MOORE und DESCHLER (2007), NAYAK und DESCHLER (2005) und von uns verwendeten Dosierung entspricht, beträgt die tägliche Erhaltungsdosis mit 2,5mg/kg Körpergewicht nur die Hälfte. Zwar beinhaltet der gesamte Behandlungszeitraum nur drei Tage, dennoch ist möglicherweise die Erhaltungsdosis von 2,5mg/kg Körpergewicht pro Tag zu niedrig gewählt, um die koronare Perfusion suffizient zu unterstützen.

4.3 Heparin

Heparin ist ein Glycosaminoglykan, das sowohl in niedermolekularer als auch in unfraktionierter Form systemisch oder lokal als Bestandteil der Spülung zur Thromboseprophylaxe angewendet wird, wobei unfraktioniertes Heparin häufiger im Antikoagulationsregime Verwendung findet (STEPHAN *et al.* 2009). Unfraktioniertes Heparin bindet Antithrombin III, Thrombin und den Gerinnungsfaktor X und reduziert so die Entstehung von Fibringerinnseln. Niedermolekulares Heparin inhibiert mit höherer Selektivität Faktor X (LEWIS UND DESCHLER 2008). Die Anwendung von unfraktioniertem Heparin zeigt in unseren Versuchen, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikante Verringerung der Nekroserate, weist allerdings mit einer mittleren Vitalitätsrate von 21,2% das schlechteste Outcome aller Medikamente auf. Im Gegensatz zu ASS, Clopidogrel und Lepirudin erweist es sich sogar als signifikant schlechter. Clexane enthält den Wirkstoff Enoxaparin, ein niedermolekulares Heparin. Die Vitalitätsrate in der mit Clexane behandelten Gruppe beträgt 36,7%. Das Ergebnis ist im Vergleich mit der Kontrolle mit einem signifikant besseren Lappenüberleben assoziiert. Jedoch zeigt sich gegenüber keiner der anderen Medikamentengruppen ein statistisch signifikanter Unterschied. Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit sind bei unfraktioniertem Heparin wesentlich geringer als bei niedermolekularem Heparin (ASKARI *et al.* 2006). Aus diesem Grund wird im Klinikalltag häufig ein Perfusor verwendet, der die kontinuierliche Gabe von unfraktioniertem Heparin ermöglicht. Dadurch können Plasmaspiegel und die gewünschte antithrombotische Wirkung konstant gehalten werden. Die Applikation von unfraktioniertem Heparin dreimal täglich eignet sich vermutlich nicht, um eben diese Effekte zu erzielen. Eine kontinuierlichere Therapie mit unfraktioniertem Heparin könnte daher einen zusätzlichen Effekt mit einer besseren Perfusion des Transplantats und einen damit einhergehenden Erhalt vitalen Gewebes erzielen.

Am Hasenmodell zeigten GREENBERG *et al.* (1988) eine verbesserte Perfusion der Femoralarterie durch die 72-stündige Dauerinfusion mit Heparin mit zusätzlicher Bolusgabe unmittelbar vor Entfernung der Approximatklemmen. Die Durchgängigkeitsrate der Heparin-Gruppe war mit 67% im Vergleich zu der Durchgängigkeitsrate von 19% in der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe signifikant höher.

Im Tierversuch vergleichen KHOURI *et al.* (1990) die unterschiedlichen Durchgängigkeitsraten an der Femoralarterie der Ratte nach antikoagulativer Therapie mit Heparin und/oder Dazmagrel. Die Applikation der Medikamente (Heparin 200 IE/kg und Dazmagrel 2,5mg/kg) erfolgte einmalig durch Injektion in die freiliegende Femoralarterie vor endgültiger Anastomosierung. Die Kontrollgruppe erhielt Kochsalzlösung. Um einen zusätzlichen thrombogenen Faktor zu schaffen, wählen KHOURI *et al.* (1990) das Crush-Avulsion-Injury-Modell nach COOLEY und HANSEN (1985). Hierbei werden zwei Gefäßklemmen auf das präparierte Gefäß gesetzt. Diese werden so lange in entgegengesetzte Richtungen gezogen, bis das Gefäß auseinander reißt und somit eine Verletzung der Intima provoziert wird. Anschließend erfolgt die Anastomosierung. Während der Operation wurde eine heparinisierte Kochsalzlösung als Spülung verwendet. In der ersten postoperativen Stunde wurde der Milking-Test verwendet, um eine mögliche Thrombosierung zu entdecken. Dieselbe Prozedur erfolgte am ersten und siebten postoperativen Tag zur Beurteilung der Gefäßdurchgängigkeit. Bei der kombinierten Gabe von Heparin und Dazmagrel zeigte sich bei keinem Tier eine Thrombosierung der Femoralarterie. Die Durchgängigkeitsrate betrug also 100%. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei jeder Versuchsgruppe eine signifikant höhere Durchgängigkeit. Der Anteil durchgängiger Gefäße in der Dazmagrel-Gruppe betrug 25%, Wundhämatome traten nicht auf. Alle Thrombosen in dieser Gruppe bildeten sich binnen der ersten postoperativen Stunde. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen der kombinierten Therapie mit Dazmagrel und Heparin und der alleinigen Therapie mit Heparin (Durchgängigkeitsrate 75%). Allerdings fand sich in beiden Gruppen, in denen Heparin verwendet wurde ein erhöhtes Vorkommen an Wundhämatomen.

FU *et al.* (1995) vergleichen in einer tierexperimentellen Studie die Durchgängigkeit eines traumatisierten Gefäßes nach intraluminaler Applikation von ca. 0,5ml einer

Lösung aus Heparin 750µg/ml, Heparin 250µg/ml, Hirudin 750µg/ml oder Hirudin 250µg/ml am Hasenmodell. Das Crush-Avulsion-Injury-Modell wurde zur Schaffung thrombogener Verhältnisse angewendet. Dabei wurde zunächst die zentrale Ohrarterie frei präpariert und mit Hilfe zweier Nadelhalter auseinandergerissen. Die traumatisierten Gefäßenden wurden anschließend End-zu-End anastomosiert und das Lumen vor der letzten Ligatur mit Kochsalz (Kontrollgruppe), Heparin oder Hirudin gespült. Die Durchgängigkeit der Anastomose wurde mit Hilfe der Milking-Technik kontrolliert. Weitere Untersuchungen auf Thrombosierung erfolgten am ersten und am siebten postoperativen Tag durch erneutes Freilegen der Gefäße und Kontrolle der Durchgängigkeit durch die Milking-Technik. Die Rate an durchgängigen Gefäßen betrug am siebten postoperativen Tag in der Heparin-Gruppe bis zu 80% und in der Hirudin-Gruppe bis zu 75%. Verglichen mit der Kontrollgruppe (Durchgängigkeit bei 13,33%) erwiesen sich die Durchgängigkeitsraten der Versuchsgruppen als statistisch hoch signifikant.

Gruppe	Anzahl	Durchgängige Gefäße nach 24 Stunden	Durchgängige Gefäße nach 7 Tagen
Heparin 750µg/ml	20	19 (95%)	16 (80%)
Heparin 250µg/ml	20	17 (85%)	13 (65%)
Hirudin 750µg/ml	20	16 (80%)	15 (75%)
Hirudin 250µg/ml	20	10 (50%)	9 (45%)
Kochsalz	30	5 (16,66%)	4 (13,33%)

Tabelle 19: Ergebnisse der Studie von Fu et al. (1995)

Ein direkter Vergleich dieser Versuche mit unserer Arbeit ist schwierig, da das Modell zur Überprüfung der Perfusion anders gewählt wurde. Die Autoren fokussieren sich hier auf die Durchgängigkeit der Anastomose und somit vor allem auf die lokale antithrombogene Wirkung in den getesteten Arterien von Heparin. Zur Auswertung dient hier das Gefäß selbst und nicht sein Versorgungsgebiet. Somit lässt sich nur der antithrombogene Effekt von Heparin untersuchen, nicht allerdings seine Wirkung auf die Gewebedurchblutung an sich.

In allen hier aufgeführten Versuchen ist das bestehende Lumen des versorgenden Gefäßes allerdings, und vor allem im nicht thrombosierten Zustand, wesentlich größer als das eines Perforatorgefäßes und gewährleistet somit auch eine

suffizientere Perfusion. Selbst im Falle einer Thrombosierung, die nicht zu einer kompletten Okkludierung des Gefäßlumens führt, wäre daher zu vermuten, dass die Perfusion des Transplantates noch höher oder vergleichbar mit der eines bestehenden Perforators wäre.

Für die Applikation wählten wir für unsere Versuche sowohl für Clexane als auch für unfraktioniertes Heparin eine Dosis von 100IE/kg Körpergewicht, wobei Clexane alle 12 Stunden und unfraktioniertes Heparin alle 8 Stunden verabreicht wurde. FU *et al.* (1995) injizieren in ihrem Versuch einmalig ca. 0,5ml eine Lösung aus 250µg/ml, bzw. 750µg/ml unfraktioniertem Heparin topisch intravasal. Bei einem durchschnittlichen Gewicht eines Hasen von etwa 2kg entspricht diese Dosis ca. 62,5µg/kg Körpergewicht bzw. 187,5µg/kg Körpergewicht.

KHOURI *et al.* (1990) applizieren ebenfalls einmalig intravasal Heparin. Die Dosierung beträgt hier 200IE/kg Körpergewicht.

Die intraoperative Heparin-gabe wird durch klinische Studien als protektiv bewertet, da durch operationsbedingten Blutverlust das Gerinnungssystem aktiviert wird. Postoperativ entsteht also eine Hyperkoagulabilität. Daher erscheint ein Therapiekonzept, das eine perioperative Antikoagulation beinhaltet, als sinnvoll. Dennoch wird die antikoagulative Medikation aus Angst vor erhöhtem intraoperativen Blutungsrisiko oft erst nach der Operation begonnen (ASKARI *et al.* 2006).

Insbesondere bei systemischer Gabe von Heparin ist das Risiko für Blutungen mit Hämatombildung erhöht. Hämatome im operierten Gebiet würden die Gefahr einer reduzierten Perfusion des Transplantates und einer mangelhaften Wundheilung bis zum Transplantatverlust mit sich führen (CONRAD UND ADAMS 2001; ASKARI *et al.* 2006). Lösungsansätze für diese Problematik finden sich in einer lokalen Heparintherapie. CONRAD und ADAMS (2001) befürworten in ihrem Review ein Therapiekonzept bestehend aus prä- und postoperativer Gabe von ASS per os über zwei Wochen kombiniert mit einem intraoperativen Heparinbolus von 50-100IE/kg Körpergewicht. Die Bolusgabe sollte vor Entfernung der Approximatklemmen, also vor Wiederherstellung des Blutflusses durch das Transplantat erfolgen. Zusätzlich empfehlen CONRAD und ADAMS (2001) intraoperativ eine aus Kochsalz und Heparin zusammengesetzte Spüllösung.

4.4 Hirudin

Hirudin ist ein selektiver Thrombin-Inhibitor. Es ist in seiner Wirkung unabhängig von Antithrombin III und inhibiert auch bereits an Fibrin gebundenes Thrombin. Dies macht es zu einem effektiveren Antikoagulanz als Heparin. Die antikoagulative Potenz von Hirudin wird durch Studien bestätigt (WALENGA *et al.* 1989; DI NISIO *et al.* 2005; ASKARI *et al.* 2006; LEWIS UND DESCHLER 2008).

LEWIS und DESCHLER (2008) untersuchen an den Femoralvenen männlicher Spargue Dawley Ratten die Wirkung einer antikoagulativen Therapie mit Desirudin auf die Durchgängigkeit und Thrombosierungsrate des Gefäßes. Eine halbe Stunde präoperativ wurde jedem Tier der Versuchsgruppe 0,75mg/kg KG Desirudin subkutan injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt stattdessen Kochsalzlösung. Die Femoralvene wurde hier mit der „Tuck“-Methode nach STEPNIK *et al.* (1994) genäht. Die Durchgängigkeit der Anastomose wurde mit Hilfe der Milking-Technik kontrolliert, nicht durchgängige Gefäße wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Nach demselben Verfahren wurde für drei Stunden nach der Anastomosierung untersucht, ob sich im Bereich der Anastomose Thromben gebildet hatten. Nach Ablauf der drei Stunden wurde das Gefäß je einen halbe Zentimeter ober- und unterhalb der Anastomose kauterisiert, dem Situs entnommen, der Länge nach eröffnet und auf Thrombenbildung inspiziert. Zusätzlich wurde die Blutungszeit bestimmt. Die Thromboserate in der Desirudingruppe betrug 3,2%, in der Kontrollgruppe 43,8%. Der Unterschied war statistisch signifikant. Bei einem Gefäß aus der Desirudingruppe, welches in der ersten postoperativen Stunde thrombotisch verschlossen war, löste sich der Thrombus spontan auf. Bei der abschließenden Untersuchung am eröffneten Gefäß fand sich keinerlei Hinweis auf eine stattgehabte Thrombosierung. Die Blutungszeit in der Desirudingruppe betrug $7,17 \pm 3$ min, in der Kontrollgruppe $5,15 \pm 1,2$ min ($p=0,27$).

Die weiter oben aufgeführte Studie von FU *et al.* (1995) bekräftigt die effektive antikoagulative Wirkung von Hirudin. Durch intraluminale Injektion von 0,5ml einer Hirudinlösung mit einer Konzentration von 250µg/ml (1) bzw. 750µg/ml (2) bestand nach 7 Tagen postoperativ noch bei 45% (1) bzw. 75% (2) eine durchgängige Anastomose.

Ein direkter Vergleich der aufgeführten Studien mit unserer Arbeit gestaltet sich, wie auch schon bei den Versuchen mit Heparin, schwierig. Zwar verifizieren die aufgeführten Arbeiten die suffizienten antithrombogenen Eigenschaften von Hirudin. Da allerdings als Beobachtungsobjekt allein der anastomosierte Bereich des versorgenden Gefäßes gilt, erlauben diese Arbeiten keine Aussagen über die Wirkung von Hirudin auf die Gesamtperfusion des Transplantates.

Unsere Arbeit bestätigt einen positiven Effekt auf die Transplantatperfusion durch Hirudin. Die Vitalitätsrate in dieser Versuchsgruppe beträgt 58,0% und ist verglichen mit den Ergebnissen in der ASS-, Heparin- und Pentoxifyllin-1-Gruppe signifikant höher. Zur Behandlung mit Clopidogrel, welches mit 63,5% die höchste Vitalitätsrate erzielt, besteht kein signifikanter Unterschied. Auch zeigte sich in der logistischen Regressionsanalyse ein signifikanter positiver Effekt durch Lepirudin auf die Vitalitätsrate des Gewebetransplantates.

4.5 Pentoxifyllin

Pentoxifyllin ist ein Xanthinderivat und gehört zur Gruppe der Rheologika. Es verbessert den kardialen Output und die myokardiale Kontraktilität. Als reflektorische Antwort sinkt der periphere Gefäßwiderstand durch Vasodilatation (AVIADO UND DETTELBACH 1984). Insgesamt führt dies zu einer verbesserten Durchblutung der verschiedenen Gewebe. Der Blutfluss wird ebenso durch Hemmung der Plättchenaggregation, Reduktion der Fibrinogenkonzentration und Erhöhung der Erythrozytenflexibilität verbessert (DETTTELBACH UND AVIADO 1985; ASKARI *et al.* 2006). Die Passage von Blutkapillaren mit einem Durchmesser von ca. 5µm gestaltet sich bei guter Verformbarkeit eines Erythrozyten (Durchmesser ca. 7µm) problemlos. Insbesondere bei alten Erythrozyten mit Veränderungen der Zellmembran ist die Flexibilität erniedrigt. Durch Aggregation steigt die Viskosität η des Blutes. Da der Volumenfluss des Blutes durch das Gefäß sich nach Hagen-Poiseulle (siehe unten) umgekehrt proportional zur Viskosität der fließenden Flüssigkeit verhält, sollte um eine möglichst effiziente Perfusion zu gewährleisten, die Viskosität möglichst niedrig gehalten werden (SILBERNAGL UND DESPOPOULOS 2007).

Gesetz von Hagen-Poiseulle: $V = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8 \eta l}$

V =Blutfluss

R =Gefäßradius

Δp =Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Gefäßes

l =Länge des Gefäßes

η =Viskosität des Blutes

Pentoxifyllin wird klassischerweise zur Therapie arterieller Verschlusskrankungen (ASKARI *et al.* 2006) benutzt. Eine positive Beeinflussung der Mikrozirkulation und Oxygenierung mikrovaskulärer Gewebetransplantat wird diskutiert (HAYDEN UND SNYDER 1993; KRONEN *et al.* 1994; MURTHY *et al.* 2003).

TRÜBESTEIN *et al.* (1981) untersuchen über einen Zeitraum von drei Monaten an 40 pAVK-Patienten die Wirkung von Pentoxifyllin auf die Durchblutung auf die untere Extremität. Bei den betroffenen Gefäßen handelte es sich um die A. femoralis, die A. iliaca und die A. poplitea. Alle Patienten waren in das Stadium Fontaine II einzustufen. 19 Patienten erhielten Buflomedil, die anderen 21 wurden mit Pentoxifyllin 300mg/Tag therapiert. Als Parameter, die zur Bewertung der Durchblutung dienten, wurden Trophik der Haut, Temperatur der Extremitäten sowie die initiale und absolute Claudicatio-Distanz herangezogen. Dabei wird die Gehstrecke, die zurückgelegt werden kann, bis ein erster Schmerz in der Extremität auftritt, als initiale Claudicatio-Distanz bezeichnet. Die gemessene Gehstrecke, die einen Abbruch des Versuches aufgrund starker Schmerzen notwendig macht, ist die absolute Claudicatio-Distanz. Während die initiale Gehstrecke weder bei der Behandlung mit Pentoxifyllin noch mit Buflomedil eine signifikante Verbesserung aufwies, erhöhte sich die absolute Claudicatio-Distanz in beiden Gruppen signifikant.

REICH *et al.* (1984) wählen zu Beginn ihrer Studie eine Pentoxifyllin-Dosis von 600mg/Tag und erhöhen diese über einen Zeitraum von vier Wochen kontinuierlich auf 1200mg/Tag. Der gesamte Behandlungszeitraum umfasste dabei 24 Wochen. Sowohl die initiale als auch die absolute Claudicatio-Distanz waren im Vergleich mit der Placebogruppe gesteigert.

KISHI *et al.* (1998) applizieren 300g schweren Wistar-Ratten Pentoxifyllin 20mg/kg Körpergewicht bzw. 40mg/kg Körpergewicht und unterbrechen anschließend den

Blutfluss der Aorta durch Setzen eines Gefäßclips für 90 Minuten. Ein Beobachtungszeitraum von 60 Minuten schloss sich an. Zur Bewertung der Perfusion wurden Blutgase gemessen, sowie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und das Membranpotential der Hinterbeinmuskulatur. Blutgase und MAP unterschieden sich in ihren Messwerten nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Das Membranpotential zeigte nach 90 Minuten Ischämiezeit in allen Gruppen eine Depolarisation, die im Laufe der Beobachtungszeit nur in den mit Pentoxifyllin behandelten Gruppen rückläufig war. Der Ausgangswert des vor der Ischämie bestehenden Ruhepotenzials wurde dennoch nicht erreicht, zwischen den beiden Pentoxifyllin-Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

MURTHY *et al.* (2003) erforschen an sechzig Sprague Dawley Ratten die Wirkung einer antikoagulativen Therapie mit niedermolekularem Heparin und/oder Pentoxifyllin. Die Applikation von niedermolekularem Heparin subkutan 1,5mg/kg Körpergewicht am Tag, Pentoxifyllin oral 24mg/kg Körpergewicht am Tag oder die Kombination aus beiden Substanzen erfolgte ab dem vierten präoperativen bis zum sechsten postoperativen Tag. Ein 3cm x 5cm großer Hautlappen der Leistenregion wurde präpariert. Anschließend erfolgte die Freilegung der proximalen Arteria femoralis und der Arteria epigastrica. Die Ligierung und Kauterisierung der umliegenden Gefäße erfolgte so, dass die Perfusion des Hautlappens letztendlich nur über die end-zu-end-anastomosierte Arteria femoralis und weiter über die Arteria epigastrica erfolgen konnte. Die Durchgängigkeit der Anastomose wurde mit der Milking-Methode überprüft. Anschließend wurde proximal der Anastomose unter kontrollierten Bedingungen mit einer Gefäßklemme eine Verletzung der Gefäßwand induziert. Der Hautlappen wurde wieder in das geschaffene Wundbett eingenäht. Die Transplantatentnahme und Auswertung erfolgte am siebten postoperativen Tag. Zusätzlich zur Beurteilung des nekrotisierten Areals bewerten MURTHY *et al.* (2003) auch die Thrombosierung und die verbliebene Durchgängigkeit der A. femoralis.

Versuchsgruppe	Anastomose			Lappen	
	Durchgängig	Thrombosiert	Vital	Grenzwertig	Nekrotisiert
Kontrolle	1	14	1	4	10
Heparin	8	7	8	3	4
Pentoxifyllin	8	7	8	3	4
Heparin und Pentoxifyllin	4	11	7	5	3
Gesamt	21	39	24	15	21

Tabelle 20: Ergebnisse der Studie von MURTHY et al. (2003)

90% der durchgängigen Anastomosen gehen mit einem vitalen Transplantat einher, während 54% der okkludierten Gefäße eine Nekrose mit sich führen. Aus 13% dieser thrombosierten Anastomosen resultiert trotz allem ein vitaler Hautlappen.

Der Verbesserung der Durchgängigkeit in der Heparin- sowie in der Pentoxifyllingruppe im Vergleich zur Kontrolle zeigt statistische Signifikanz. Die Verbesserung bei kombinierter Therapie ist im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant.

HAYDEN und SNYDER *et al.* (1993) untersuchen an männlichen Sprague Dawley Ratten die Wirkung von Pentoxifyllin am Random Skin Flap. Die Gabe von Pentoxifyllin 10mg/kg Körpergewicht erfolgte intraperitoneal alle zwölf Stunden bis zum siebten postoperativen Tag. Der Beginn der antikoagulativen Therapie variierte bei den einzelnen Versuchsgruppen zwischen unmittelbar vor Lappenhebung (Gruppe A), eine Stunde (Gruppe B), zwei Tage (Gruppe C) und zwei Wochen (Gruppe D) präoperativ. Die Kontrollgruppe erhielt Tage vor der Lappenhebung 1,5ml Kochsalzlösung intraperitoneal im 12-Stunden-Rhythmus. Allein für Gruppe A konnte hierbei eine signifikante Vergrößerung des nekrosefreien Areals im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Unsere Versuche untermauern die rheologische Wirksamkeit von Pentoxifyllin. Die Anwendung des Medikaments erscheint tatsächlich nur dann als sinnvoll, wenn die Applikation etwa zwei Wochen präoperativ erfolgt. Diese These wird durch die Ergebnisse unserer Arbeit ebenfalls gestützt. Die Versuchsgruppe, in der die Tiere Pentoxifyllin bereits 14 Tage vor der Operation bekamen, weist eine Vitalitätsrate von

46,2% auf. Das Ergebnis ist sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch gegenüber den Versuchsgruppen Heparin, HES 6% und Pentoxifyllin (1) signifikant. Eine Vitalitätsrate von 23,9% hingegen resultiert bei Applikation unmittelbar vor der Lappenhebung. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von der Vitalitätsrate in der Kontrollgruppe, erweist sich allerdings als signifikant niedriger als die Ergebnisse in den Gruppen Lepirudin, Clopidogrel und Pentoxifyllin (2). Die tägliche Applikationsdosis betrug in beiden Gruppen 4,5mg/kg Körpergewicht und wurde postoperativ für sieben Tage weitergeführt.

HAYDEN und SNYDER *et al.* (1993) variieren mit dem Zeitpunkt des Therapiebeginns stärker. Allerdings zeigte nur die Gruppe, in der das Medikament unmittelbar vor Operationsbeginn verabreicht wurde, eine signifikante Verbesserung im Transplantatüberleben. Die Dosierung ist dabei mit 20mg/kg Körpergewicht mehr als viermal höher, als sie von uns gewählt wurde.

Auch MURTHY *et al.* (2003) wählen mit 24mg/kg Körpergewicht eine um ein Vielfaches höhere Dosis. Der Behandlungszeitraum der antikoagulativen bzw. rheologischen Therapie umfasst die Zeit vom vierten präoperativen bis zum sechsten postoperativen Tag. Dabei erweist sich die Behandlung mit Pentoxifyllin als wirksam. In Kombination mit Heparin zeigt sich jedoch keine signifikante Verbesserung im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Betrachtet man die Ergebnis-Tabelle fällt auf, dass allen Gruppen, außer in der mit kombinierter Heparin- und Pentoxifyllintherapie, die Anzahl der grenzwertigen und nekrotischen Lappentransplantate genau der Anzahl der thrombosierten Gefäße entsprechen. Bei kombinierter Therapie übersteigt die Anzahl der grenzwertigen und nekrotischen Transplantate die Anzahl der entstandenen Thrombosen. Möglicherweise ist die antikoagulative Wirkung durch ein kombiniertes Therapie-Schema zu hoch, sodass ggf. dadurch entstandene kleine Hämatome die adäquate Perfusion des Gewebes stören.

KISHI *et al.* (1998) beginnen mit der Pentoxifyllingabe erst unmittelbar vor Okkludierung der Aorta. Die Dosierung ist auch hier mit 20 bzw. 40mg/kg Körpergewicht hoch gewählt. Der späte Behandlungsbeginn könnte ein Grund dafür sein, weshalb bei KISHI *et al.* (1998) abgesehen von einer rückläufigen Depolarisation die Behandlung mit Pentoxifyllin im Vergleich zur Placebogruppe keine signifikanten Messergebnisse keine signifikanten Unterschiede aufweist.

In den klinischen Studien von REICH *et al.* (1984) und TRÜBESTEIN *et al.* (1981) wird ein positiver Effekt auf die absolute Claudicatiodistanz nach Pentoxifyllintherapie

nachgewiesen. TRÜBESTEIN *et al.* (1981) verabreichen Pentoxifyllin in einer täglichen Menge von 300mg pro Tag. Bezogen auf einen 70kg-schweren erwachsenen Menschen entspricht dies einer Dosierung von etwa 4,3mg/kg Körpergewicht. REICH *et al.* (1984) beginnen das Therapieschema mit einer doppelt so hohen Dosierung und steigern diese im Verlauf nochmals auf das Zweifache. REICH *et al.* (1984) konnten zusätzlich eine Verbesserung der initialen Claudicatio-Distanz nachweisen.

4.6 Hydroxyethylstärke (HES 6%)

Hydroxyethylstärke ist ein Stärkepräparat, das bis 2013 vorzugsweise in der Volumentherapie Anwendung fand. Dabei zählt es zu den kolloidalen Plasmaersatzmitteln. Kolloidale Lösungen diffundieren in der Regel nicht durch Zellmembranen und haben eine hohe Wasserbindungsfähigkeit. Dadurch halten sie den kolloidosmotischen Druck aufrecht. Ist die Wasserbindungsfähigkeit höher als die der Plasmaproteine, wird zusätzlich Wasser aus dem Gewebe ins Gefäß gezogen. Das daraus resultierende intravasale Volumen ist so - nach Infusion einer kolloidalen Lösung - also größer, als das der Infusion selbst. Es handelt sich bei kolloidalen Plasmaersatzmitteln also um Volumenexpander (STRIEBEL 2012). Durch Hämodilution wird die Blutviskosität herabgesetzt und der Blutfluss erhöht (Gesetz nach Hagen-Poiseulle) (SILBERNAGL UND DESPOPOULOS 2007). Die Wirkdauer von HES beträgt ca. drei bis vier Stunden. HES wird zum größten Teil über die Nieren eliminiert. Die tägliche Maximaldosis für HES 6% beträgt 33ml/kg Körpergewicht. Höhere Konzentrationen, insbesondere bei fehlender Kombination mit kristalloiden Infusionslösungen, können die Ursache für schwere Nierenschäden sein (STRIEBEL 2012). Aufgrund seines Nebenwirkungsprofils wird die Anwendung von HES seit Juni 2013 nicht mehr empfohlen.

SALEMARK *et al.* (1991) untersuchten am Hasenmodell die Wirkung von Dextrane auf die Durchgängigkeit der zentralen Ohrarterie. Dabei wurde dieses Gefäß in einer Versuchsgruppe durchtrennt und anschließend in End-zu-End-Technik reanastomosiert. In einer anderen Versuchsgruppe wurde durch Verletzung der Intima ein stark thrombogen wirkender Faktor erzeugt. Beide Gruppen erhielten 1,7g/kg Körpergewicht Dextrane 40 etwa eine Stunde präoperativ. Die Kontrollgruppen, in denen chirurgisch ebenso verfahren wurde, wie bei den oben beschriebenen Versuchsgruppen, erhielten Kochsalz. An einer weiteren Gruppe wurde

allein die Veränderung des Hämatokritwertes bei Dextrangabe nach dem oben aufgeführten Schema evaluiert. Diese Gruppe erfuhr keine chirurgische Intervention. Anhand der Milking-Technik wurde postoperativ die Durchgängigkeit der zentralen Ohrarterie beurteilt. Zusätzlich dienten radioaktiv markierte Thrombozyten, die den Tieren präoperativ transfundiert wurden, als Parameter zur Beurteilung der Thrombozytenakkumulation. Die Blutungszeiten waren in den mit Dextrane behandelten Gruppen länger als in den Kontrollgruppen. Der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. Die Plättchenaktivität nach Reperfusion ist in allen Gruppen stark erhöht. Es gibt keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchsgruppe, in der die Gefäßintima traumatisiert wurde, bewirkt die Applikation von Dextrane im Vergleich mit der Kontrolle eine signifikante Verbesserung der Gefäßdurchgängigkeit. In dem End-zu-End-Anastomosen-Modell unterscheidet sich die Durchgängigkeit des Gefäßes in der mit Dextranen behandelten Gruppe nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Jedoch ist eine positive Tendenz zu erkennen. Die Hämatokritwerte sinken im Verlauf von 180 Minuten nach Infusion von Dextranen von 40 auf bis zu 78% ihres Ausgangswertes.

In einer weiteren Studie von SALEMARK *et al.* (1995) steht vor allem die Langzeitwirkung von Dextranen auf die Lappenperfusion im Fokus. Das operative Vorgehen gestaltete in diesem Versuch ähnlich des Vorgehens von SALEMARK *et al.* (1991). Die zentrale Ohrarterie am Hasen wurde freigelegt und die Gefäßintima traumatisiert. In dieser Arbeit erfolgte die gleiche operative Durchführung auch an der zentralen Ohrvene. Die Therapie mit Dextrane 17ml/kg Körpergewicht wurde zwei Stunden präoperativ begonnen, und am ersten, dritten und fünften postoperativen Tag mit einer zusätzlichen Gabe von 8,5ml/kg Körpergewicht weitergeführt. Messung der Gefäßdurchgängigkeit und Explantation erfolgten nach einer, nach zwei oder nach vier Wochen. Die Durchgängigkeit beider Gefäße, Arterie und Vene, war in den ersten zwei Stunden postoperativ signifikant höher. Die nach einer und nach zwei Wochen gemessenen Werte unterschieden sich allerdings nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Nach Dextrangabe ist die arterielle Blutungszeit im Vergleich zur venösen signifikant prolongiert. Im Vergleich zur Kontrolle ist nur die arterielle Blutungszeit signifikant verlängert.

GUSTAFSSON *et al.* (1981) erforschen an 12 Mongrel-Hunden die Wirkweise von hoch- und niedermolekularem Dextran auf den Blutfluss und die Viskosität am durch Nervenstimulation aktivierten Muskel und am ruhenden Muskel. Dazu wurde die Hinterbeinmuskulatur frei präpariert und von allen Gefäßen bis auf die A. femoralis isoliert. Die Applikation hochmolekularem Dextran (1,0g/kg KG) zusammen mit homologen Erythrozytenkonzentraten (200ml; Hkt: 90%) bzw. niedermolekularem Dextran (1,5g/kg KG) erfolgte über eine extrakorporale Zirkulation mit Anschluss an die A. femoralis. Papaverin wurde in der Gruppe ohne Nervenstimulation zur Vasodilatation verabreicht. Mit Hilfe einer Klemme wurde schrittweise das Volumen der A. femoralis verengt und parallel dazu distal der Stenose mit einem Katheter der Perfusionsdruck gemessen. Die Viskosität *in vivo* wurde anhand der Vergleiche der Perfusionsdrücke der verschiedenen Einzellösungen (Blut, hoch-, bzw. niedermolekulares Dextran) mit dem *in vivo* Perfusionsdruck abgeschätzt. Zusätzlich erfolgte eine Messung der Viskosität *in vitro*. Nach Gabe hochmolekularer Dextraneinfusion sank der Blutfluss in der Versuchsgruppe mit Papaverin auf 30% des Ausgangswertes. In der Gruppe, in der die Simulation des N. ischiadicus erfolgte, sank sie auf 45%. Im Anschluss an die Applikation der niedermolekularen Dextranlösung stieg der Fluss in der Papaverin-Gruppe wieder auf 60% des Ausgangswertes an. In der Ischiadicus-Gruppe wurde eine Steigerung des Blutflusses auf 70% des Ausgangswertes beobachtet. Die Viskosität stieg nach Infusion hochmolekularer Dextranlösung in der Papaverin-Gruppe auf 250% des Ausgangswertes, in der Ischiadicus-Gruppe auf 120%. Nachdem niedermolekulares Dextran appliziert wurde, sank die Viskosität in der in beiden Gruppen, blieb aber in der Papaverin-Gruppe noch 65% über dem ursprünglichen Wert und in der Ischiadicus-Gruppe 45% darüber.

Ein direkter Vergleich der aufgeführten Studien mit unserer Arbeit gestaltet sich schwierig. Eine positive Wirkung kolloidaler Plasmaersatzmittel auf die Prävention von Thrombosen wird in den Arbeiten von SALMARK *et al.* (1991; 1995) durchaus bestätigt. Ebenso wird eine Beeinflussung des Blutflusses durch Veränderung der Blutviskosität und des Hämatokrits untermauert. In unserer Arbeit konnte für HES 6% eine signifikante Reduktion der Nekrosezone im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Dennoch erzielt HES, verglichen mit Pentoxifyllin (2), Lepirudin und Clopidogrel, signifikant schlechtere Ergebnisse. Durch

operationsbedingten Blutverlust wird das Gerinnungssystem aktiviert. Es kommt zur Hyperkoagulabilität. Die Viskosität des Blutes ist damit erhöht. Möglicherweise erzielen Antikoagulanzen wie Clopidogrel oder Lepirudin hier einen stärkeren Effekt, als kolloidale Infusionslösungen in der Dosierung, die wir zur Therapie gewählt hatten. SALEMARK *et al.* (1995) wählen zur antithrombotischen Therapie Dextrane 40 (40 kD) initial 17ml/kg KG und zur Fortführung 8,5 ml/kg KG alle 48 Stunden und erzielen zumindest in der frühen postoperativen Phase signifikante antithrombotische Effekte. In unserer Arbeit applizieren wir 7,5ml/kg KG alle 12 Stunden HES 6% mit einem mittleren Molekulargewicht von 130 kD. Diese Menge an kolloidaler Infusionslösung ist also höher gewählt als bei SALEMARK *et al.* (1995). Die Vitalitätsrate am siebten postoperativen Tag beträgt 25,8% und ist zur Kontrolle signifikant höher. Ähnlich wie bei SALEMARK *et al.* (1995) ist der Effekt der antithrombotischen Wirkung von Dextrane unmittelbar postoperativ am größten. Die postoperativen Messungen unserer Studie zeigen eine geringe Zunahme des Blutflusses. Obwohl der Fluss bis zum Explantationstag um mehr als die Hälfte sinkt, ist eine ausreichende Durchblutungssituation auch eine Woche postoperativ noch gegeben. Eine noch höher gewählte Dosis von HES 6% könnte die Perfusion gegebenenfalls noch stärker fördern. Die Tageshöchstdosis von Volulyte® beträgt 50ml/kg KG. Unser Therapieschema sieht eine Dosierung von 15mg/kg KG am Tag vor und ist daher also noch steigerungsfähig. Allerdings muss beachtet werden, dass bei hohen Volumina die Applikation nicht als Bolus sondern als kontinuierliche Infusion erfolgen sollte, um eine akute Volumenbelastung zu vermeiden.

4.7 Fazit

Obwohl die antikoagulative Therapie in der rekonstruktiven Chirurgie immer mehr an Bedeutung gewinnt, existiert bisher kein einheitliches Therapieschema. Im klinischen Alltag variieren die Konzepte bezüglich der bevorzugten Substanz und der Dosierung je nach Belieben des behandelnden Chirurgen. Diese Problematik spiegelt sich auch in den tierexperimentellen Studien wider. Insbesondere die Dosierungen der angewandten Medikamente sind stets unterschiedlich gewählt. Auch der Beginn der Therapie variiert von Studie zu Studie. So ist es zunächst schwierig die Wirkung allein der Substanz selber auf die Durchblutungsverhältnisse im Transplantat zu beurteilen, da die gewählte Dosierung und der Zeitpunkt des Therapiebeginns das Outcome maßgeblich beeinflussen. Diese Problematik erklärt auch warum die oben

aufgeführten Studien zu den einzelnen Medikamenten häufig unterschiedliche Resultate ausweisen, obwohl dieselbe Substanz verwendet wurde. In unserer Studie kann eine verbesserte Durchblutungssituation für fast alle Medikamente nachgewiesen werden. Insbesondere Clopidogrel und Lepirudin zeigen in ihrer Wirkung hohe Signifikanz. Die gewählten Dosierungen orientieren sich dabei an den in der Klinik gebräuchlichen Schemata. Ein nächster wichtiger Schritt wäre die Übertragung der errungenen Erkenntnisse vom Rattenmodell auf den Menschen. Ob hier mit denselben Medikamenten in gleicher Dosierung ähnliche Effekte erzielt werden, bleibt abzuwarten. Diese Frage bietet neues Forschungsmaterial für weitere interessante Studien.

5 Zusammenfassung

Die rekonstruktive Mikrochirurgie gewinnt in der onkologischen Therapie zunehmend an Bedeutung. Die ästhetische und funktionelle Wiederherstellung der resezierten Region ist für den Erhalt der Lebensqualität und die Genesung des Patienten essentiell. Komplikationen wie Vasospasmen, Hämatombildung oder Thrombosierung können häufig einen Verlust des Transplantates mit sich führen. Patienten mit Tumoren im Mund- und Rachenraum haben aufgrund ihres Lebensstils und parallel bestehender kardiopulmonaler Vorbelastungen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten der oben genannten Komplikationen. Eine Optimierung der Gewebepfusion und Reduktion von Thrombenbildung soll die Einheilung des Transplantates zusätzlich unterstützen und Komplikationen minimieren. Aktuell besteht allerdings kein einheitliches Konzept zur Antikoagulation bei mikrovaskulärem Gewebettransfer. Mit dem Ziel das Therapieregime zur Verbesserung der Gewebepfusion bei mikrovaskulären Lappentransplantaten optimieren, wird in dieser tierexperimentellen Arbeit die Wirkung diverser antikoagulativ und rheologisch wirksamer Medikamente auf die Durchblutungssituation im Transplantat untersucht.

Als Versuchstiere dienten 108 männliche Wistar-Ratten. Diese wurden in acht Versuchsgruppen und folglich eine Kontrollgruppe mit jeweils zwölf Tieren eingeteilt. Bei allen Tieren wurde der epigastrische Perforanslappens gehoben und anschließend wieder in sein ursprüngliches Bett eingenäht. Die Durchblutung des Transplantats erfolgte auf diese Weise nur durch ein einziges kleines Perforansgefäß

anstelle eines Gefäßstiels. Jede Versuchsgruppe erhielt präoperativ und in einem standardisierten Schema bis zum siebten postoperativen Tag eine antikoagulative Therapie mit ASS, Clopidogrel, Pentoxifyllin, Hirudin, HES, Heparin oder Clexane. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde stattdessen Kochsalz injiziert. Die Entwicklungen der Transplantate im Verlauf der Versuche wurden mittels Fotodokumentation festgehalten. Messungen wurden mit Hilfe eines O2C-Geräts durchgeführt, welches unter anderem Blutfluss und Flussgeschwindigkeit im Transplantat feststellt, durchgeführt. Die Explantation der Transplantate und Euthanasie der Tiere erfolgte am siebten postoperativen Tag. Zur planimetrischen Erfassung der Nekrosezonen wurde das Programm ImageJ verwendet.

In den Versuchen zeigten alle Medikamente - außer Pentoxifyllin, wenn es nur eine Stunde vor Lappenhebung verabreicht wurde - eine signifikant geringere Nekrosezone als die Kontrolle. Als hochsignifikant erwiesen sich ASS mit einer Vitalitätsrate von 38,1%, Lepirudin mit einer Vitalitätsrate von 58,0%, Clopidogrel mit einer Vitalitätsrate von 63,5% und Pentoxifyllin - bei Applikation 14 Tage vor Lappenhebung - mit einer Vitalitätsrate von 46,2% ($p < 0,001$).

Ein einheitliches Konzept zur antikoagulativen Therapie in der rekonstruktiven Mikrochirurgie existiert bisher nicht. Ebenso heterogen gestalten sich die experimentellen Arbeiten zu diesem Thema. Zur Beurteilung der Perfusion wird häufig nur die Durchgängigkeit des anastomosierten Gefäßstiels herangezogen, nicht aber die Vitalität des perfundierten Gewebes selbst. Auf diese Weise können aber nur die antithrombotischen Wirkungen der Antikoagulanzen erfasst werden, nicht die antiinflammatorischen und/oder rheologischen Effekte. Auch im Applikationsschema weichen die Studien bezüglich Zeitpunkt und Menge stark voneinander ab. Durch die Applikation der verwendeten Medikamente nach einem von uns festgelegten Applikationsschema konnte die Nekrosezone im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden. Die Verwendung eines epigastrischen Perforanslappen erlaubte es uns, die gesamte Durchblutungssituation des Transplantats und damit auch die rheologische und antiinflammatorische Wirkung der Medikamente zu beurteilen. Insbesondere die Effekte von Lepirudin und Clopidogrel wiesen auch im Vergleich zu den anderen Medikamenten eine signifikante Verbesserung der Durchblutungssituation auf. Eine mögliche Kombination der verwendeten Antikoagulanzen zur weiteren Verbesserung der

Transplantatperfusion, ebenso wie die Anwendung der errungenen Kenntnisse am Menschen bietet Forschungsmaterial für weitere Studien.

6 Literaturverzeichnis

- Abdualkader, A. M., Ghawi, A. M., Alaama, M., Awang, M., Merzouk, A. (2013). "Leech Therapeutic Applications." Indian J Pharm Sci **75**(2): 127-137.
- Acland, R. (1977). MicrosurgeryPracticeManual.
- Askari, M., Fisher, C., Weniger, F.G., Bidic, S., Lee, WP. (2006). "Anticoagulation therapy in microsurgery: a review." J Hand Surg Am **31**(5): 836-46.
- Aviado, D. M. and Dettelbach, H. R. (1984). "Pharmacology of pentoxifylline, a hemorrheologic agent for the treatment of intermittent claudication." Angiology **35**(7): 407-17.
- Blondeel, N., Vanderstraeten, G. G., Monstrey, S.J., Van Landuyt, K., Tonnard, P., Lysens, R., Boeckx, W.D., Matton, G. (1997). "The donor site morbidity of free DIEP flaps and free TRAM flaps for breast reconstruction." Br J Plast Surg **50**(5): 322-30.
- Bourget, A., Chang, J. T., Wu D.B., Chang C.J., Wei F.C. (2011). "Free flap reconstruction in the head and neck region following radiotherapy: a cohort study identifying negative outcome predictors." Plast Reconstr Surg **127**(5): 1901-8.
- Brands, M. T., van den Bosch, S. C., Dieleman, F.J., Bergé, S.J., Merckx, M.A. (2010). "Prevention of thrombosis after microvascular tissue transfer in the head and neck. A review of the literature and the state of affairs in Dutch Head and Neck Cancer Centers." Int J Oral Maxillofac Surg **39**(2): 101-6.
- Chernichenko, N., Ross, D. A., Shin, J., Sasaki, C.T., Ariyan, S. (2008). "End-to-side venous anastomosis with an anastomotic coupling device for microvascular free-tissue transfer in head and neck reconstruction." Laryngoscope **118**(12): 2146-50.
- Chien, W., Varvares, M. A., Hadlock, T., Cheney, M., Deschler, D.G. (2005). "Effects of aspirin and low-dose heparin in head and neck reconstruction using microvascular free flaps." Laryngoscope **115**(6): 973-6.
- Clark, J. R., McCluskey, S. A., Hall, F., Lipa, J., Neligan, P., Brown, D., Irish, J., Gullane, P., Gilbert, R. (2007). "Predictors of morbidity following free flap reconstruction for cancer of the head and neck." Head Neck **29**(12): 1090-101.
- Conrad, M. H. and Adams, W. P., Jr. (2001). "Pharmacologic optimization of microsurgery in the new millennium." Plast Reconstr Surg **108**(7): 2088-96; quiz 2097.
- Cooley, B. C. and Hansen, F. C. (1985). "Microvascular repair following local crush and avulsion vascular injury." Microsurgery **6**(1): 46-8.
- Dettelbach, H. R. and Aviado, D. M. (1985). "Clinical pharmacology of pentoxifylline with special reference to its hemorrheologic effect for the treatment of intermittent claudication." J Clin Pharmacol **25**(1): 8-26.
- Di Nisio, M., Middeldorp, S., Büller, H.R. (2005). "Direct thrombin inhibitors." N Engl J Med **353**(10): 1028-40.
- Erdmann, D., Sweis, R., Wong, M.S., Niklason, L.E., du Laney, T.V., Levin, L.S., Klitzman, B., Olbrich, K.C. (2003). "Vascular endothelial growth factor expression in pig latissimus dorsi myocutaneous flaps after ischemia reperfusion injury." Plast Reconstr Surg **111**(2): 775-80.
- Fu, K., Izquierdo, R., Walenga, J.M., Fareed, J. (1995). "Comparative study on the use of anticoagulants heparin and recombinant hirudin in a rabbit traumatic anastomosis model." Thromb Res **78**(5): 421-8.
- Greenberg, B. M., Masem, M., May, J.W. Jr. (1988). "Therapeutic value of intravenous heparin in microvascular surgery: an experimental vascular thrombosis study." Plast Reconstr Surg **82**(3): 463-72.
- Grobe, A., Michalsen, A., Hanken, H., Schmelzle, R., Heiland, M., Blessmann, M. (2012). "Leech therapy in reconstructive maxillofacial surgery." J Oral Maxillofac Surg **70**(1): 221-7.
- Gustafsson, L., Appelgren, L., Myrvold, H.E. (1981). "Blood flow and in vivo apparent viscosity in working and non-working skeletal muscle of the dog after high and low molecular weight dextran." Circ Res **48**(4): 465-9.
- Hallock, G. G. (2003). "Direct and indirect perforator flaps: the history and the controversy." Plast Reconstr Surg **111**(2): 855-65; quiz 866.

- Hanasono, M. M., Barnea, Y., Skoracki, R.J. (2009). "Microvascular surgery in the previously operated and irradiated neck." Microsurgery **29**(1): 1-7.
- Hausamen, J.E., Reuther, J., Machtens, E., Eufinger, H., Kübler, A., Schlipf, H. (2012). Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Operationslehre und -atlas 4., vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag.
- Hayden, R. E. and Snyder, B. J. (1993). "Pharmacologic manipulation of random skin flaps with pentoxifylline." Laryngoscope **103**(2): 185-8.
- Hupkens, P. and Cooley, B. C. (1996). "Comparison of arterial and venous patency in a rat model of subendothelium-stimulated thrombosis." Microsurgery **17**(4): 226-9.
- Ito, H., Okamura, A., Iwakura, K., Masuyama, T., Hori, M., Takiuchi, S., Negoro, S., Nakatsuchi, Y., Taniyama, Y., Higashino, Y., Fujii, K., Minamino, T. (1996). "Myocardial perfusion patterns related to thrombolysis in myocardial infarction perfusion grades after coronary angioplasty in patients with acute anterior wall myocardial infarction." Circulation **93**(11): 1993-9.
- Jones, N. F., Jarrahy, R., Song, J.I., Kaufman, M.R., Markowitz, B. (2007). "Postoperative medical complications--not microsurgical complications--negatively influence the morbidity, mortality, and true costs after microsurgical reconstruction for head and neck cancer." Plast Reconstr Surg **119**(7): 2053-60.
- Ketchum, L. D. (1978). "Pharmacological alterations in the clotting mechanism: use in microvascular surgery." J Hand Surg Am **3**(5): 407-15.
- Khoury, R. K., Cooley, B. C., Kenna, D.M., Edstrom, L.E. (1990). "Thrombosis of microvascular anastomoses in traumatized vessels: fibrin versus platelets." Plast Reconstr Surg **86**(1): 110-7.
- Khoury, R. K., Cooley, B. C., Kunselman, A.R., Landis, J.R., Yeramian, P., Ingram, D., Natarajan, N., Benes, C.O., Wallemark, C. (1998). "A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome." Plast Reconstr Surg **102**(3): 711-21.
- Khoury, R. K., Sherman, R., Buncke, H.J. Jr., Feller, A.M., Hovius, S., Benes, C.O., Ingram, D.M., Natarajan, N.N., Sherman, J.W., Yeramian, P.D., Cooley, B.C. (2001). "A phase II trial of intraluminal irrigation with recombinant human tissue factor pathway inhibitor to prevent thrombosis in free flap surgery." Plast Reconstr Surg **107**(2): 408-15; discussion 416-8.
- Kishi, M., Tanaka, H., Seiyama, A., Takaoka, M., Matsuoka, T., Yoshioka, T., Sugimoto, H. (1998). "Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia." Am J Physiol **274**(5 Pt 2): H1435-42.
- Knight, K. R. (1994). "Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps." Microsurgery **15**(10): 675-84.
- Kronen, G., Ferder, M., Hunzicker, K., Strauch, B. (1994). "The use of pentoxifylline in microvascular surgery." J Reconstr Microsurg **10**(1): 17-20.
- Kruse, A. L., Luebbers, H. T., Grätz, K.W., Obwegeser, J.A. (2010). "Factors influencing survival of free-flap in reconstruction for cancer of the head and neck: a literature review." Microsurgery **30**(3): 242-8.
- Lee, S. and Thiele, C. (2010). "Factors associated with free flap complications after head and neck reconstruction and the molecular basis of fibrotic tissue rearrangement in preirradiated soft tissue." J Oral Maxillofac Surg **68**(9): 2169-78.
- Lewis, C. M. and Deschler, D. G. (2008). "Desirudin reduces the rate of microvenous thrombosis in a rat model." Laryngoscope **118**(7): 1149-52.
- Lineaweaver, W. C., Lei, M. P., Mustain, W., Oswald, T.M., Cui, D., Zhang, F. (2004). "Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival." Ann Surg **239**(6): 866-73; discussion 873-5.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. (2010). Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen, Thieme.
- Mehta, S. R., Tanguay, J. F., Eikelboom, J.W., Jolly, S.S., Joyner, C.D., Granger, C.B., Faxon, D.P., Rupprecht, H.J., Budaj, A., Avezum, A., Widimsky, P., Steg, P.G.,

- Bassand, J.P., Montalescot, G., Macaya, C., Di Pasquale, G., Niemela, K., Ajani, A.E., White, H.D., Chrolavicius, S., Gao, P., Fox, K.A., Yusuf, S. (2010). "Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial." Lancet **376**(9748): 1233-43.
- Moore, M. G. and Deschler, D. G. (2007). "Clopidogrel (Plavix) reduces the rate of thrombosis in the rat tuck model for microvenous anastomosis." Otolaryngol Head Neck Surg **136**(4): 573-6.
- Mucke, T., Borgmann, A., Fichter, A.M., Wagenpfeil, S., Mitchell, D.A., Ritschl, L.M., Kesting, M.R., Wolff, K.D. (2013). "The influence of different VEGF administration protocols on the perfusion of epigastric flaps in rats." Br J Oral Maxillofac Surg **51**(6): 555-62.
- Mucke, T., Muller, A. A., Kansy K, Hallermann, W., Kerkmann, H., Schuck, N., Zeilhofer, H.F., Hoffmann, J., Hölzle, F.; DÖSAK collaborative group for Microsurgical Reconstruction. (2011). "Microsurgical reconstruction of the head and neck--current practice of maxillofacial units in Germany, Austria, and Switzerland." J Craniomaxillofac Surg **39**(6): 449-52.
- Mucke, T., Rau, A., Weitz, J., Ljubic, A., Rohleder, N., Wolff, K.D., Mitchell, D.A., Kesting, M.R. (2012). "Influence of irradiation and oncologic surgery on head and neck microsurgical reconstructions." Oral Oncol **48**(4): 367-71.
- Murthy, P., Riesberg, M. V., Hart, S., Bustillo, A., Duque, C.S., Said, S., Civantos, F.J. (2003). "Efficacy of perioperative thromboprophylactic agents in the maintenance of anastomotic patency and survival of rat microvascular free groin flaps." Otolaryngol Head Neck Surg **129**(3): 176-82.
- Nahabedian, M. Y., Singh, N., Deune, E.G., Silverman, R., Tufaro, A.P. (2004). "Recipient vessel analysis for microvascular reconstruction of the head and neck." Ann Plast Surg **52**(2): 148-55; discussion 156-7.
- Nayak, V. K. and Deschler, D. G. (2005). "Clopidogrel use for reducing the rate of thrombosis in a rat model of microarterial anastomosis." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **131**(9): 800-3.
- Nichols, T. C., Dillow, A. M., Franck, H.W., Merricks, E.P., Raymer, R.A., Bellinger, D.A., Arruda, V.R., High, K.A. (2009). "Protein Replacement Therapy and Gene Transfer in Canine Models of Hemophilia A, Hemophilia B, von Willebrand Disease, and Factor VII Deficiency." Ilar j **50**(2): 144-67.
- Pattani, K. M., Byrne, P., Boahene, K., Richmon, J. (2010). "What makes a good flap go bad? A critical analysis of the literature of intraoperative factors related to free flap failure." Laryngoscope **120**(4): 717-23.
- Pederson, W. C. (2008). "Clinical use of anticoagulants following free tissue transfer surgery." J Hand Surg Am **33**(8): 1435-6.
- Pohlenz, P., Blessmann, M., Heiland, M., Blake, F., Schmelzle, R., Li, L. (2007). "Postoperative complications in 202 cases of microvascular head and neck reconstruction." J Craniomaxillofac Surg **35**(6-7): 311-5.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2008). Duale Reihe Biochemie, Thieme.
- Reich, T., Cutler, B. C., Lee, B.Y., Porter, J.M., Reichle, F.A., Scogin, J.T., Strandness, D.E. (1984). "Pentoxifylline in the treatment of intermittent claudication of the lower limbs." Angiology **35**(7): 389-95.
- Ridha, H., Jallali, N., Butler, P.E. (2006). "The use of dextran post free tissue transfer." J Plast Reconstr Aesthet Surg **59**(9): 951-4.
- Rosenberg, A. J., Van Cann, E. M., van der Bilt, A., Koole, R., van Es, R.J. (2009). "A prospective study on prognostic factors for free-flap reconstructions of head and neck defects." Int J Oral Maxillofac Surg **38**(6): 666-70.
- Ruby, L. K., Greene, M., Risitano, G., Torrejon, R., Belsky, M.R. (1984). "Experience with epigastric free flap transfer in the rat: technique and results." Microsurgery **5**(2): 102-4.

- Salemark, L., Knudsen, F., Dougan P. (1995). "The effect of dextran 40 on patency following severe trauma in small arteries and veins." Br J Plast Surg **48**(3): 121-6.
- Salemark, L., Wieslander, J. B., Dougan, P., Arnljots, B. (1991). "Studies of the antithrombotic effects of dextran 40 following microarterial trauma." Br J Plast Surg **44**(1): 15-22.
- Schmid-Schonbein, H. (1981). "Blood rheology and physiology of microcirculation." Ric Clin Lab **11 Suppl 1**: 13-33.
- Serletti, J. M., Higgins, J. P., Moran, S., Orlando, G.S. (2000). "Factors affecting outcome in free-tissue transfer in the elderly." Plast Reconstr Surg **106**(1): 66-70.
- Shalom, A., Friedman, T., Westreich, M. (2008). "Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats." Dermatol Surg **34**(6): 785-90; discussion 790.
- Silbernagl, S. and Despopoulos, A. (2007). Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Song, D.H., Henry G., Reid, R.R., Wu, L.C., Wirth, G., Dorafshar, A.H.(2007) "Essentials for Students Workgroup." The American Society of Plastic Surgeons® (ASPS®).
- Soutar, D. S. and McGregor, I. A. (1986). "The radial forearm flap in intraoral reconstruction: the experience of 60 consecutive cases." Plast Reconstr Surg **78**(1): 1-8.
- Soutar, D. S., Scheker, L. R., Tanner, N.S., McGregor, I.A. (1983). "The radial forearm flap: a versatile method for intra-oral reconstruction." Br J Plast Surg **36**(1): 1-8.
- Stephan, B., Schenk, J. F., Nemeš, A., Pindur, G. (2009). "The use of antithrombotic agents in microvascular surgery." Clin Hemorheol Microcirc **43**(1-2): 51-6.
- Stepnick, D. W., Hayden, R. E., Hogikyan, N.D. (1994). "Development of thrombosis models in the rabbit." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **120**(9): 997-1002.
- Stockmans, F., Stassen, J. M., Vermylen, J., Hoylaerts, M.F., Nyström, A. (1997). "A technique to investigate microvascular mural thrombus formation in arteries and veins: II. Effects of aspirin, heparin, r-hirudin, and G-4120." Ann Plast Surg **38**(1): 63-8.
- Strauch, B. and Murray, D. E. (1967). "Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm. in external diameter using microsurgical techniques." Plast Reconstr Surg **40**(4): 325-9.
- Striebel, H. W. (2012). Anästhesie - Intensivmedizin - Notfallmedizin, Schattauer GmbH.
- Suh, J. D., Sercarz, J. A., Abemayor, E., Calcaterra, T.C., Rawnsley, J.D., Alam, D., Blackwell, K.E. (2004). "Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **130**(8): 962-6.
- Tremblay, D. M., Harris, P. G., Gagnon, A.R., Cordoba, C., Brutus, J.P., Nikolis, A. (2008). "Heparin-induced thrombocytopenia syndrome as a cause of flap failure: a report of two cases." J Plast Reconstr Aesthet Surg **61**(1): 78-83.
- Trubestein, G., Trubestein, R., Duong, Q.D. (1981). "Comparative evaluation of the effectiveness of buflomedil and pentoxifylline in patients with arterial occlusive disease." Angiology **32**(10): 705-10.
- van 't Hof, A. W., Liem, A., de Boer, M.J., Zijlstra, F. (1997). "Clinical value of 12-lead electrocardiogram after successful reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Zwolle Myocardial infarction Study Group." Lancet **350**(9078): 615-9.
- Walenga, J. M., Pifarre, R., Hoppensteadt, D.A., Fareed, J. (1989). "Development of recombinant hirudin as a therapeutic anticoagulant and antithrombotic agent: some objective considerations." Semin Thromb Hemost **15**(3): 316-33.
- Yang, Y. J., Zhao, J. L., You, S.J., Wu, Y.J., Jing, Z.C., Yang, W.X., Meng, L., Wang, Y.W., Gao, R.L. (2006). "Different effects of tirofiban and aspirin plus clopidogrel on myocardial no-reflow in a mini-swine model of acute myocardial infarction and reperfusion." Heart **92**(8): 1131-7.
- Zhang, F., Lei, M. P., Oswald, T.M., Pang, Y., Blain, B., Cai, Z.W., Lineaweaver, W.C. (2003). "The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds." Br J Plast Surg **56**(4): 334-41.
- Zhang, F., Waller, W., Lineaweaver, W.C. (2004). "Growth factors and flap survival." Microsurgery **24**(3): 162-7.

7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ADP	Adenosin-Diphosphat
ASA	American-Society-of-Anaesthesiologists
ASS	Acetylsalicylsäure
cm	Zentimeter
EU	Europäische Union
g	Gramm
HES	Hydroxyethylstärke
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
Hkt	Hämatokrit
IE	Internationale Einheit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M.	Musculus
MAP	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrogramm
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
O ₂ C	Oxygen-To-See
OP	Operation
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
rHb	Hämoglobinkonzentration
RIVA	Ramus interventricularis anterior

SpO2

SPSS

V.

VEGF

Hämoglobinoxygenierung

Statistical Package for the Social
Sciences

Vena

Vascular-Endothelial-Growth-Factor

8 Danksagungen

Zu Beginn danke ich all den Personen, die mich während der Zeit meiner Dissertationsarbeit begleitet haben. Erst durch ihre Unterstützung war es mir möglich diese Arbeit zu verwirklichen. Für die Hilfe, die Geduld und das entgegengebrachte Vertrauen bin ich ihnen besonders verbunden.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Mücke für die Darreichung eines interessanten Dissertationsthemas, die zahlreichen Anregungen zum Thema und für die außergewöhnliche Betreuung bedanken. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit für mich nicht möglich gewesen. Er war stets ein hilfsbereiter und geduldiger Ansprechpartner, Freund und Lehrer.

Auch gilt ein besonderer Dank den Mitgliedern der mikrochirurgischen Arbeitsgruppe: Dr. med. Andreas Fichter, Anna Borgmann sowie Dr. med. Lucas Ritschl. Ihnen danke ich sehr für ihre Geduld und ihre großartige Unterstützung und für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent Klaus-Dietrich Wolff danke ich herzlich für seine großartige Unterstützung und das Bereitstellen der Räumlichkeiten, der Instrumente und sonstiger Arbeitsmaterialien.

Ein großer Dank gilt meiner lieben Familie, die mich in meinem Studium und meiner Dissertation fortwährend unterstützt hat. Ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen.