

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Extrakorporale Perfusion und Vitalerhaltung von freien Muskeltransplantaten mit Blutersatzlösungen - eine experimentelle Studie an der Schweinezunge

Dr. med. Constantin Tibor Wolff

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

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Herbert Deppe

2. Priv.-Doz. Dr. Dr. Achim von Bomhard

Die Dissertation wurde am 19.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2022 angenommen.

- *Meiner Familie* -

Inhaltsverzeichnis

Extrakorporale Perfusion und Vitalerhaltung von freien Muskeltransplantaten mit Blutersatzlösungen - eine experimentelle Studie an der Schweinezunge

1	Einleitung	1
1.1	Gewebettransfer	1
1.2	Extrakorporale Membranoxygenierung	2
1.2.1	Allgemeines Funktionsprinzip	2
1.2.2	Geschichtliches	2
1.2.3	Einsatzgebiete	3
1.2.3.1	Transplantationsmedizin	3
1.2.3.2	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie	4
1.3	Konservierungs- und Perfusionslösungen	5
1.3.1	University of Wisconsin Lösung	5
1.3.2	Weitere Konservierungslösungen	6
1.3.3	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nährlösung	7
1.3.4	Natriumchlorid	8
1.4	Problematik und Fragestellung	10
2	Material und Methodik.....	11
2.1	Versuchspräparate	11
2.2	Versuchsdurchführung	12
2.2.1	Vorbereitende Maßnahmen und Transport	12
2.2.2	Chirurgische Präparation und Anschluss an das Perfusionssystem.....	12
2.2.3	Inkubation und Extinktionsmessung	14
2.3	Arbeitsmittel.....	16
2.3.1	Perfusionssystem	16
2.3.2	Testverfahren zum Vitalitätsnachweis.....	17
2.3.2.1	MTS/PMS Assay	17
2.3.2.2	Photometrische Extinktionsmessung	19
2.4	Statistische Auswertung.....	20

3	Ergebnisse	21
3.1	Allgemeine Parameter.....	21
3.1.1	Gewicht	21
3.1.2	Flow	22
3.1.3	Weitere Parameter	23
3.2	Einzelauswertungen.....	24
3.2.1	University of Wisconsin Lösung	24
3.2.2	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nährlösung	25
3.2.3	Natriumchlorid	27
3.2.4	Nicht perfundiert.....	28
3.3	Weitergehende statistische Analyse	31
4	Diskussion	34
4.1	Material und Methodik	34
4.1.1	Pilotcharakter der angewandten Methodik.....	34
4.1.2	Praktikabilität, Komplikationen und Fehlerquellen	34
4.1.3	Arbeitsmittel	36
4.2	Ergebnisse.....	38
4.3	Begleitende Versuche und relevante Vorarbeiten.....	41
4.4	Literaturvergleich.....	42
4.5	Ausblick	44
5	Zusammenfassung.....	47
6	Literaturverzeichnis	48
7	Anhang	60
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	60
7.2	Tabellenverzeichnis.....	61
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	63
8	Veröffentlichung.....	65
9	Danksagung	66

1 Einleitung

1.1 Gewebetransfer

Der chirurgische Gewebetransfer umfasst ein breites Spektrum verschiedener Verfahren in der plastisch-rekonstruktiven Medizin zur Wiederherstellung der funktionellen und ästhetischen Integrität bei Defektkonstellationen, die durch operativ-ablative Verfahren, Traumata oder Fehlbildungen verursacht sein können. Dabei kommen je nach Ausmaß und Lokalisation des jeweiligen Defekts unterschiedlich aufwendige Rekonstruktionsmaßnahmen zur Anwendung, die sich in der sog. „rekonstruktiven Leiter“ (s. Abb. 1) widerspiegeln (Fichter, 2015; Janis, Kwon, & Attinger, 2011; Wolff, C., 2017). Als Richtmaß dient sie zur Orientierung, mit der das operative Vorgehen bezogen auf die Komplexität des Eingriffs schrittweise gesteigert werden kann. Neuerungen dieser gedanklichen Stütze integrieren eine Vielzahl an weiteren operativen Optionen, wie z.B. die Vakuumtherapie oder die Gewebeexpansion (Janis et al., 2011). Darüber hinaus wird von anderen Autoren die freie Wahlmöglichkeit zur Vorgehensweise bei Rekonstruktionsmaßnahmen unabhängig von der Möglichkeit zur Anwendung eines weniger komplexen Vorgehens im Sinne eines „rekonstruktiven Aufzugs“ propagiert (Gottlieb & Krieger, 1994). Gemeinsam ist allen Möglichkeiten jedoch dabei, dass sie an einem bestimmten Punkt an die Grenzen ihrer Durchführbarkeit gelangen. Dies trifft insbesondere im Falle mehrfacher Voroperationen und damit einhergehender Narbenbildung zu, da hier die Mobilisation und Verschiebung oder Transposition von lokalem Gewebe nahezu unmöglich werden kann. Ebenso gilt dies auch für Bestrahlungen, die als (adjuvante) Therapieoption bei Malignomen infrage kommt und als Nebenwirkung eine eingeschränkte Wundheilung mit Ulzerationen sowie atrophe Haut und ausgeprägte Fibrosierungen des betroffenen Gewebes hinterlässt (Haubner, Ohmann, Pohl, Strutz, & Gassner, 2012). Auch der Transfer von freien Gewebetransplantaten als oberste Sprosse der „rekonstruktiven Leiter“ kann durch Intimafibrose mit konsekutiven atherosklerotischen Veränderungen oder Entzündungsreaktionen mit daraus folgender Thrombosierung und Gefäßobstruktion der potenziellen Anschlussgefäße aufgrund einer vorangegangenen

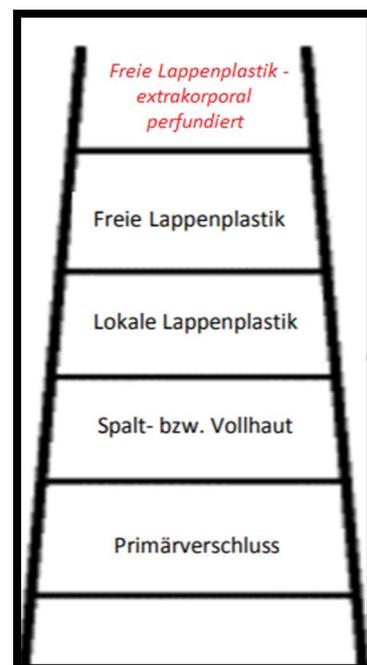


Abbildung 1: Rekonstruktive Leiter, modifiziert (Wolff, C. 2017)

Bestrahlung zu einer komplikationsanfälligen oder gar unmöglichen Therapieoption werden (Fichter, 2015; Tall, Bjorklund, Skogh, Arnander, & Halle, 2015). Zwar existieren für solche Fälle aufwendige chirurgische Alternativen (s. 1.2.3.2), dennoch wären einfache und sicher durchzuführende Maßnahmen wünschenswert.

1.2 Extrakorporale Membranoxygenierung

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) beschreibt eine Methode für den artifiziellen und funktionellen Ersatz von Herz- und Lungenfunktion. Sie wird auch als „Extracorporeal Life Support“ (ECLS) oder „Extracorporeal Lung Assist“ (ECLA) bezeichnet und kann als veno-arterielle (VA) und veno-venöse (VV) Variante angewendet werden. Dabei arbeiten beide Methoden respiratorisch supportiv, wohingegen lediglich die VA ECMO hämodynamisch unterstützend wirkt (Bartlett, 2017).

1.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Grundlegendes Funktionsprinzip einer Herz-Lungen-Maschine ist die Sauerstoffanreicherung von venösem Blut und die nachfolgende Rückführung zurück zum Patienten. Nach Ausleitung von venösem Patientenblut in ein speziell beschichtetes Schlauchsystem wird dieses über einen Pumpenantrieb weiter zu einem Oxygenator zur Sauerstoffanreicherung und CO₂-Eliminierung geleitet und dann als arterialisiertes Blut zum Patienten rückgeführt. Ein separater Wasserkreislauf ist für die Thermoregulation zuständig und verhindert ein Absinken der Temperatur auf hypotherme Werte. Zudem messen und überwachen Sensoren durchgängig verschiedene Parameter wie Druck, Fluss und Temperatur.

1.2.2 Geschichtliches

Die extrakorporale Membranoxygenierung als solche lässt sich als Weiterentwicklung von einfachsten Herz-Lungen-Maschinen beschreiben, deren erste Verwendung zurückzuführen ist auf die Jahre um 1885, in denen von Frey und Gruber erste tierexperimentelle Organperfusionsstudien durchführten (Frey & Gruber, 1885; Schmid & Philipp, 2011; Zimmer, 2003). Wenig später wurde erstmalig eine Rollerpumpe zur Aufrechterhaltung eines gerichteten Blutflusses eingesetzt (Allen, 1888) und diese durch weiterführende Entwicklungen zur Doppelrollerpumpe verbessert, mit deren Hilfe nun auch eine Quantifizierung der Pumpleistung realisierbar war (Schmid & Philipp, 2011; Truax, 1899).

Aufgrund der Effizienz ist dieses Grundprinzip noch heute Bestandteil vieler extrakorporaler Zirkulationssysteme (Cooley, 1987; DeBakey, 1934; Schmid & Philipp, 2011).

1.2.3 Einsatzgebiete

Ein Haupteinsatzgebiet von Herz-Lungen-Maschinen stellt vornehmlich die Herzchirurgie dar. Typische Indikationsstellungen sind dabei Herztransplantationen, Aorten- und Mitralklappenersatz bzw. -rekonstruktionen, Aneurysmen und komplexe, seltene Herzfehler. Darüber hinaus findet die Herz-Lungen-Maschine aber auch Anwendung bei Lungenerkrankungen und -transplantationen sowie in der Notfall- und Intensivmedizin. Eine Indikation stellt zum Beispiel das akute Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) dar, das vielfältige Ursachen wie Polytrauma, Schock oder Sepsis haben kann. Hier erweist sich die Anwendung der ECMO in Studien als effektiv durch Steigerung der Überlebensraten betroffener Patienten (Madershahian et al., 2007; Mildh et al., 2011; Musial et al., 2015). Auch bei schweren Brandverletzungen mit Folgekomplikationen und seltenen Indikationen wie einer Atemwegsobstruktion nach Stentimplantation aufgrund tracheoösophagealer Fisteln wird die ECMO mittlerweile erfolgreich eingesetzt (Kennedy, Thayer, Beuno, Kohorst, & Kumar, 2017; Nosanov, McLawhorn, Vigiola Cruz, Chen, & Shupp, 2017; Patton, Simone, Kraut, Anderson, & Haith, 1998; Wang, Xu, Zhan, & Zhang, 2014). Ebenso ist das Einsatzgebiet der extrakorporalen Membranoxygenierung nicht auf eine Altersgruppe beschränkt. Sie findet sowohl Anwendung bei erwachsenen Patienten als auch bei Neugeborenen, Säuglingen und Kindern, die durch ihre verminderte Ischämie- und Hypoxietoleranz besondere Aufmerksamkeit und Zuwendung von Seiten des Behandlers bedürfen (Feindt, Harig, & Weyand, 2006). Beispielhaft kann hier die sekundäre Ateminsuffizienz aufgrund einer Mekoniumaspiration als Indikation angeführt werden (Maksoud-Filho et al., 2001).

1.2.3.1 Transplantationsmedizin

Die Anwendung der extrakorporalen Membranoxygenierung im Rahmen der Transplantationsmedizin stellt ein vergleichsweise junges Einsatzgebiet dar. Zwar führten Marchioro et al. 1963 bereits erste Untersuchungen am Hund durch (Marchioro, Huntley, Waddell, & Starzl, 1963). Eine an der menschlichen Niere angewandte extrakorporale Membranoxygenierung, die im Rahmen einer postmortalen Spende nach Herz-Kreislauf-Stillstand gewonnen wurde, ist aber erst 1989 durch Koyama veröffentlicht worden (Koyama

et al., 1989). Der bis dahin regelhaft zur Anwendung kommenden hypothermen Organperfusion wurde erstmals 1997 die Idee der normothermen Organreperfusion im Zusammenhang mit günstigen Auswirkungen auf die Zellvitalität gegenübergestellt (Arias-Diaz et al., 1997; Barrou, Billault, & Nicolas-Robin, 2013; Gonzalez et al., 1997; Tabet et al., 1997). Ein Jahr später wurde dann erstmalig eine menschliche Niere und Anfang des 21. Jahrhunderts eine menschliche Leber nach einer postmortalen Spende mithilfe der normothermen ECMO transplantiert (Barrou et al., 2013; Fondevila et al., 2012; Valero et al., 1998). Nasralla et al. konnten in einer Studie mit über 200 normotherm perfundierten Lebern zeigen, dass diese ein um 50% geringeres Risiko an Organschäden aufwiesen als herkömmlich kaltgelagerte Organe (Nasralla et al., 2018). Barrou et al. resümierten schließlich in ihrer Arbeit, dass die experimentelle Forschung zur Nutzung der normothermem ECMO mit dem Ziel der Vermeidung von Zellschäden - bedingt durch die warme Ischämie - weiter vorangetrieben werden sollte, um optimale Voraussetzungen für Transplantationen zu schaffen (Barrou et al., 2013).

1.2.3.2 Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Das Fachgebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) umfasst ein weites Spektrum operativer Eingriffe. Sowohl kleinere dentoalveoläre und ästhetische Fragestellungen als auch die Traumatologie mit Beteiligung des Viscerocraniums und seinen umliegenden Weichgeweben sowie Fehlbildungen, wie z.B. Dysgnathien und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG), zählen zu den gängigen OP-Indikationen.

Zudem ist aber auch die (rekonstruktive) Tumorchirurgie im Kopf-Hals-Bereich ein großes Teilgebiet der MKG. Hierbei ist es nicht selten notwendig, dass autologes Gewebe zur Rekonstruktion des im Rahmen der Tumorresektion verursachten Defektes benötigt wird. Vor allem freie Lappen spielen dabei als Transplantate mit eigenständiger Gefäßversorgung wegen ihrer breiten Einsatzmöglichkeiten eine entscheidende Rolle. Jedoch stößt auch dieses Verfahren, das mithilfe mikrochirurgischer Techniken Spender- und Empfängergefäße miteinander anastomosiert, immer wieder an seine Grenzen. Bedingt durch Voroperationen oder Bestrahlungen im Operationsgebiet und damit einhergehend oft unzureichenden oder gar fehlenden geeigneten Anschlussmöglichkeiten für das Transplantat, bedarf es häufig aufwendiger Operationstechniken, z.B. durch Anwendung eines „carrier-flaps“, bei dem meist die A. und V. radialis als „bridge vessels“ zur Versorgung des Transplantates an der Defektseite genutzt werden (Wolff, K. D. et al., 2009).

Um das Repertoire für Lösungsansätze bei den auch als „vessel depleted neck“ bezeichneten Fällen zu erweitern, soll die vorliegende Arbeit daher auch die Möglichkeiten und Weiterentwicklungen einer temporären, extrakorporalen Perfusion von freien Gewebetransplantaten untersuchen und vorantreiben (Wolff, K. D. et al., 2020).

1.3 Konservierungs- und Perfusionslösungen

Konservierungslösungen bezeichnen Flüssigkeiten bestehend aus unterschiedlichen Gemischen von Elektrolyten und Aminosäuren, um Organe und Gewebe zu konservieren. Sie werden auch als Perfusionslösungen bezeichnet, wenn sie im Rahmen einer maschinellen Perfusion zur Organkonservierung eingesetzt werden.

1.3.1 University of Wisconsin Lösung

Die von Belzer und Southard im Jahr 1988 vorgestellte University of Wisconsin (UW) Lösung wurde im Bestreben nach einer für alle zur Transplantation geeigneten Organe einsetzbaren Lösung entwickelt. Die bis dahin regelhaft zur Anwendung kommenden Lösungen erwiesen sich lediglich bei der langfristigen Konservierung von Nieren als hilfreich. Andere Organe wie Herz, Pankreas, Lunge oder Leber wurden für nur maximal sechs bis zehn Stunden konserviert, da sich der Metabolismus der Organe stark unterscheidet und es bis zu diesem Zeitpunkt aufgrund fehlender impermeanter Bestandteile nicht zu einer ausreichenden Suppression von Zellödemen kam (Belzer & Southard, 1988). Durch die neu entwickelte Zusammensetzung der Konservierungsflüssigkeit (s.u.) konnten erstmals das Pankreas im tierexperimentellen Modell über einen Zeitraum von 72 Stunden (Wahlberg, Love, Landegaard, Southard, & Belzer, 1987) sowie die Leber für 30 Stunden und länger konserviert werden und damit aufgrund des Zeitgewinns die Transplantation oben genannter Organe von schnellstmöglich durchzuführenden Operationen hin zu semi-elektiven Eingriffen verwirklicht werden (Belzer & Southard, 1988).

Die UW Lösung zeichnet sich besonders durch die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe sowie der verglichen zu anderen Perfusionslösungen hohen Kalium- und niedrigen Natriumkonzentrationen aus. Daneben enthält die durchsichtige Lösung in erster Linie metabolisch inerte Substanzen, die eine gleichbleibende osmotische Konzentration garantieren sollen. Sie besitzt verglichen zu Wasser eine dreifach erhöhte Viskosität (Fridell, Mangus, & Tector, 2009; Grzella, 2016) und beugt durch die hinzugefügte Hydroxyethylstärke

effektiv einem Zellödem vor (Belzer & Southard, 1988). Weiterhin beinhaltet die UW Lösung Phosphat als Puffersubstanz, um einen leicht alkalischen und dem Blut ähnlichen pH-Wert von 7,4 bei einer Temperatur von 20°C zu garantieren. Bildung und Wirkung von freien Sauerstoffradikalen werden durch beigefügtes Allopurinol und das Antioxidans Glutathion gestört. Die genaue Zusammensetzung der Perfusionslösung kann der unten genannten Tabelle (Tab. 1) entnommen werden.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten UW Perfusionslösung bei einem pH von 7,4, einer Osmolalität von 320mosmol/kg und einer Temperatur von 2-8°C (Angabe der Firma Bridge to Life, London, Großbritannien)

Substanz	Konzentration (g/l)
Poly(0-2-hydroxyethyl)stärke	50
Lactobionsäure	35,83
Kaliumhydroxid-Lösung	5,61
Natriumhydroxid-Lösung 40%	3,679
Adenosin	1,34
Allopurinol	0,136
Kaliumhydrogenphosphat	3,4
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,23
Raffinose-Pentahydrat	17,83
Glutathion	0,922

1.3.2 Weitere Konservierungslösungen

Neben der UW Lösung kommen einige weitere Perfusionslösungen im Rahmen der Transplantationsmedizin zum Einsatz. Häufig verwendet wird dabei die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) Lösung. Sie wurde ursprünglich in den späten 1960er Jahren als kardioplege Lösung von Bretschneider entwickelt und enthält mit Histidin ein potentes Puffersystem (Bretschneider, 1980; Schneeberger et al., 2009). Tryptophan dient als Membranstabilisator, Ketoglutarat als Substrat für den anaeroben Stoffwechsel (Schneeberger et al., 2009). Sie grenzt sich durch eine niedrige Kaliumkonzentration, niedrige Viskosität und geringere Kosten von der UW Lösung ab (Schneeberger et al., 2009). Als eine Art Vorläufer der UW Lösung wurde 1969 von Geoffrey Collins eine nach ihm benannte Konservierungslösung beschrieben, die heute mit einem davon abgeleiteten Derivat als Euro-Collins (EC) Lösung bekannt ist (Collins, Bravo-Shugarman, & Terasaki, 1969). Damit konnten in den darauffolgenden Jahren bei Tierversuchen Nieren über lange Zeiträume von bis zu 72

Stunden konserviert werden (Arai et al., 1993; Collins, Jones, & Halasz, 1977; Sacks, Petritsch, & Kaufman, 1973). Eine neuere Variante stellt die Perfadex-Lösung dar. Sie ist eine kaliumarme Elektrolytlösung mit kolloidalen Anteilen und enthält zusätzliche Puffer und Dextran, die die Endothelfunktion verbessern sowie antithrombotische Effekte zeigen (Gertz, Rennels, & Nelson, 1975; Keshavjee et al., 1992). Sie wird insbesondere im Rahmen der Lungentransplantationsmedizin verwendet und hat sich in Versuchen anderen Lösungen, wie der EC-Lösung, als überlegen erwiesen (Gohrbandt et al., 2015; Ingemansson, Massa, Pandita, Sjöberg, & Steen, 1995; Oto et al., 2006; Rabanal et al., 2003). Weiterhin verbreitet ist die sogenannte „Steen-solution“, die inzwischen sowohl im Rahmen von Lungen- als auch Lebertransplantationen zur extrakorporalen normothermen Perfusion angewendet wird (Cypel et al., 2008; Pagano et al., 2017; Selzner et al., 2016; Steen et al., 2003; Steen et al., 2001). Sie enthält ebenfalls Dextran und zusätzlich Humanalbumin, um einen physiologischen onkotischen Druck zu generieren und damit das Risiko von Ödemen zu minimieren. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass eine Vielzahl an Perfusionslösungen existiert, die im Laufe der Zeit regelmäßig modifiziert und den unterschiedlichen zu transplantierenden Geweben angepasst werden mit dem Ziel einer möglichst physiologischen Zusammensetzung.

1.3.3 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nährlösung

Die nach Renato Dulbecco und Harry Eagle benannte Lösung (Eagle, 1959) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) ist ein seit mehreren Jahrzehnten bekanntes Nährmedium mit breiter Anwendungsmöglichkeit sowohl für humane als auch für tierische Zellen. Sie setzt sich in erster Linie aus anorganischen Salzen, Aminosäuren, Glucose, Natriumpyruvat und Vitaminen zusammen und wird vielfältig und fachübergreifend für biologische und medizinische Zwecke verwendet. Mittlerweile existiert sie in multiplen Varianten für verschiedene Fragestellungen und wird unter anderem als Nährmedium für Spalthauttransplantate genutzt (Boekema, Boekestijn, & Breederveld, 2015; Hurst, Lindsay, & Lee, 1973; Kiyozumi et al., 2006; Tosun, Aktan, Hosnuter, Savaci, & Duman, 2001). Hier zeigten sich in Untersuchungen die Nährlösungen im Vergleich zur Kochsalzlösung zum Zwecke der Aufbewahrung als überlegen (Hurst et al., 1973; Tosun et al., 2001). Auch wurden im Rahmen von Experimenten periphere Nerventransplantate in speziellen DMEM Nährlösungen für Schwann-Zellen aufbewahrt. Die Ergebnisse zeigten hier bessere Regenerationsraten als bei Aufbewahrung in Organperfusionslösungen wie der bereits o.g. HTK-Lösung (Lassner, Becker, Fansa, Walter, & Berger, 1995). Aufgrund des hohen Energiebedarfs von Muskelzellen, der

vielfältigen und breiten Anwendungsmöglichkeiten sowie der einfachen und kostengünstigen Verfügbarkeit, ist DMEM als weitere Perfusionslösung für die Durchführung der Experimente eingesetzt worden. Die genaue Zusammensetzung des Nährmediums ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammensetzung der DMEM Nährlösung (modifiziert, Kasper, 2006)

Substanz	Konzentration (mg/l)	Substanz	Konzentration (mg/l)
NaCl	6400	L-Methionin	30
KCl	400	L-Phenylalanin	66
CaCl ₂	200	L-Threonin	95
MgSO ₄	98	L-Tryptophan	16
NaH ₂ PO ₄	125	L-Tyrosin	72
D-Glucose	4500	L-Valin	94
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1	Glycin	30
Na-Pyruvat	110	L-Serin	42
Phenolrot	15	Cholin Chlorid	4
NaHCO ₃	3700	Folsäure	4
L-Arginin-HCl	84	Myoinositol	7,2
L-Cystin	48	Nicotinamid	4
L-Histidin-HCl-H ₂ O	42	Pyridoxal-HCl	4
L-Isoleucin	105	Riboflavin	0,4
L-Leucin	105	Thiamin-HCl	4
L-Lysin-HCl	146	D-Ca-Panthenat	4

1.3.4 Natriumchlorid

Als weitere Perfusionslösung ist zum Vergleich eine Natriumchlorid-Lösung 0,9% (NaCl) verwendet worden. Als gängige Infusionslösung kommt sie im klinischen Alltag als Flüssigkeitsersatz, bei Elektrolytstörungen oder als Trägersubstanz für andere Wirkstoffe regelhaft zur Anwendung. Die als „Kochsalzlösung“ bekannte Flüssigkeit ist dabei nur annähernd physiologisch, da sie sich insbesondere bezüglich ihrer Ionenkonzentration und ihres pH-Werts zum normalen Blutserum unterscheidet (Reddi, 2013). Große Volumina können deshalb auch ihrerseits zu Elektrolytstörungen, insbesondere Hyperchlorämie und Hybernatriämie sowie zu metabolischen Azidosen und Ödemen führen (Li, H., Sun, Yap, Chen, & Qian, 2016). Sie ist leicht verfügbar und im Vergleich zu anderen Infusionslösungen kostengünstig zu erwerben (Grundpreis ca. 3-4 Euro/Liter).

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Kochsalzlösung. Die Angaben beziehen sich dabei auf 1000ml Lösung. (Angabe der Firma Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland)

Substanz	Konzentration
Natriumchlorid	9,0g
Natrium	154mm/l
Chlorid	154mm/l
Weitere Bestandteile	
Aqua ad iniectionabilia, Salzsäure 25%, Natriumhydroxid	



Abbildung 2: Von links nach rechts: Verwendete Belzer UW® Perfusionslösung der Firma Bridge to Life, DMEM Nährlösung der Firma Sigma-Aldrich und isotonische Kochsalzlösung der Firma Fresenius Kabi GmbH

1.4 Problematik und Fragestellung

Der freie Gewebettransfer ist ein gängiges und erfolgreiches Verfahren in vielen plastisch und funktionell chirurgisch-rekonstruktiven Disziplinen. Es stößt aber trotz vielfältiger Anwendungsmöglichkeiten und ständiger Weiterentwicklung chirurgischer Techniken, möglicher Entnahmestellen sowie instrumentellem und technischem Fortschritt immer wieder an seine Grenzen. So bedingen insbesondere Voroperationen und strahlentherapeutische Interventionen im Operationsgebiet durch reduzierte Vaskularisierung verminderte Erfolgswahrscheinlichkeiten bezogen auf die Einheilung des Transplantates (Ang et al., 2003; Bozikov & Arnez, 2006; Hanasono, Barnea, & Skoracki, 2009; Wolff, K. D. et al., 2020). Verschiedene Techniken kommen dann zur Anwendung, um das vaskuläre Minderangebot zu beherrschen, wie z.B. die bereits o.g. Möglichkeit des „wrist-carrier-flaps“ (Wolff, K. D. et al., 2009) oder die Anwendung von Gefäßinterponaten. Diese bergen allerdings ein erhöhtes Komplikationsrisiko bis hin zum Transplantatverlust (Ethunandan, Cole, & Flood, 2007; Maricevich, Lin, Liu, Chang, & Hanasono, 2018) und sind für Patient und Behandler gleichermaßen mit einem enormen Aufwand verbunden.

Ein Ziel dieser Arbeit soll deshalb die Suche nach einer weiteren, komplikationsarmen Möglichkeit sein, um die oben geschilderte Problematik zu überwinden und folgende Fragen zu beantworten:

- Gelingt die chirurgisch-maschinelle Verknüpfung von Präparat und ECMO zur Aufrechterhaltung eines Kreislaufs mit einer Perfusionslösung?
- Ist das angewandte Testverfahren zum Vitalitätsnachweis zuverlässig?
- Gelingt es die Schweinezungen durch die ECMO vital zu erhalten?
- Erweist sich eine der verwendeten Perfusionslösungen dabei als überlegen?

2 Material und Methodik

2.1 Versuchspräparate

Die für die Versuchsdurchführung verwendeten Schweinezungen haben sich in vielerlei Hinsicht als ideale Versuchspräparate herausgestellt. Als reine Muskeltransplantate bestehen sie aus stark hypoxieempfindlichen Zellen mit hohen metabolischen Ansprüchen (Kruit et al., 2019), sodass die Fragestellung der Vitalerhaltung und einer möglichen Minderperfusion gut zu untersuchen war. Anatomisch haben sie große Ähnlichkeiten zur menschlichen Zunge. Insbesondere die beidseits angelegte A. lingualis, die als Anschlussmöglichkeit für das Perfusionssystem diente, sowie die in unmittelbarer Nachbarschaft verlaufenden gleichnamigen Nerven sind in der MKG-Chirurgie, aber auch bei kleineren dentoalveolären Eingriffen von großer Bedeutung. Schließlich sind sie einfach und kostengünstig zu erwerben, was den organisatorischen und finanziellen Aufwand im Rahmen der Studie erheblich erleichterte.

Eine bei der Versuchsplanung initial angedachte Perfusion der Präparate mit Schweineblut ist aus mehreren Gründen nicht durchgeführt worden. Zum einen stellte die Gewinnung und Zuordnung des Schweinebluts zum jeweils passenden Präparat sowie der Transport und die gerinnungsfreie Konservierung desselben die Versuchsdurchführung vor große organisatorische Probleme und Hürden. Zum anderen sollten im Rahmen der Studie bewusst Blutersatzlösungen als Perfusionsmedien eingesetzt werden, um Gerinnungs- und Infektionsrisiken einer möglichen Eigenblutentnahme und -perfusion in einer potenziell zukünftigen klinischen Anwendung am Patienten zu minimieren. In diesem Zusammenhang sollte ebenso von der Verwendung von wertvollen und wenig verfügbaren Erythrozytenkonzentraten abgesehen werden.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Vorbereitende Maßnahmen und Transport

Die Versuchsdurchführungen erfolgten in den Forschungslaboren der Abteilung für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München. Als vorbereitende Maßnahme wurde das Schlauchsystem der ECMO-Einheit (s. 2.3.1) mit der jeweiligen Perfusionslösung befüllt und anschließend in Betrieb genommen. Weiterhin wurden alle benötigten Materialien und Instrumente bereitgelegt, um einen schnellstmöglichen Anschluss der Schweinezungen an die ECMO zu gewährleisten. Anschließend wurden diese nach Schlachtung unter Standard-Atmosphäre vom Schlacht- und Viehhof München (Zenettistraße 9, 80337 München) abgeholt und bei konstanter Temperatur, die mithilfe eines Thermometers kontrolliert wurde, in einem dichten Transportbehältnis zum Forschungslabor verbracht.

2.2.2 Chirurgische Präparation und Anschluss an das Perfusionssystem

Im Forschungslabor wurden die Präparate vorsichtig mit Wasser von Blut- und Geweberesten befreit, auf Unversehrtheit überprüft und im Bereich der Papillae vallatae mit Hilfe eines Skalpell gekürzt. Nun wurde die A. lingualis aufgesucht und vorsichtig freipräpariert. Vor Kanülierung und Anschluss an das Schlauchsystem der ECMO wurden die Gefäße der Schweinezunge über die A. lingualis mit heparinierter Ringerlösung durchgespült und damit von etwaigen Thromben gereinigt. Der Anschluss erfolgte im Weiteren über eine Venenverweilkanüle mit einer Größe von 18 Gauge, die mit einem Ethilon® 6-0 Faden am Gefäß befestigt wurde (s. Abb. 3). Das Präparat ist nun in einer modifizierten Nierenschale als Reservoir platziert worden, aus dem die Lösung nach Perfusion der Schweinezunge in ein weiteres Behältnis ablaufen konnte. Von hier aus ist sie mithilfe steriler Spritzen wieder in das Schlauchsystem der ECMO überführt worden, sodass ein in sich geschlossener Kreislauf vorlag.



Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der kanülierten A. lingualis mit zahlreichen Abgängen. Die darüberliegende Muskulatur ist mit Haltnähten seitlich fixiert (*). Ansicht von unten.

Vor Beginn der Versuchsreihen sind mehrere Testläufe durchgeführt worden, um sicherzustellen, dass über die Konnektionsstelle und die A. lingualis die Perfusionslösungen sämtliche Abschnitte der Schweinezunge erreichen (s. Abb. 4). Dafür ist einer Vergleichslösung Toluidinblau beigemischt worden, ein blauer, kationischer Farbstoff, der nicht nur bei histologischen Fragestellungen, sondern auch in der Vitalfärbung und der medizinischen Diagnostik vielfältige Anwendung findet (Bundesärztekammer, 2008).

Anschließend wurde nach definierten Zeitabständen Muskelgewebe mithilfe eines Skalpell (Klingenform 11) und einer Präparierschere in proximalen und distalen Bereichen der Zunge entnommen. Dabei wurde zur Standardisierung des Vorgehens streng darauf geachtet, dass die Areale der entnommenen Gewebeproben mit den zuvor entnommenen Bereichen übereinstimmten (s. Abb. 4).

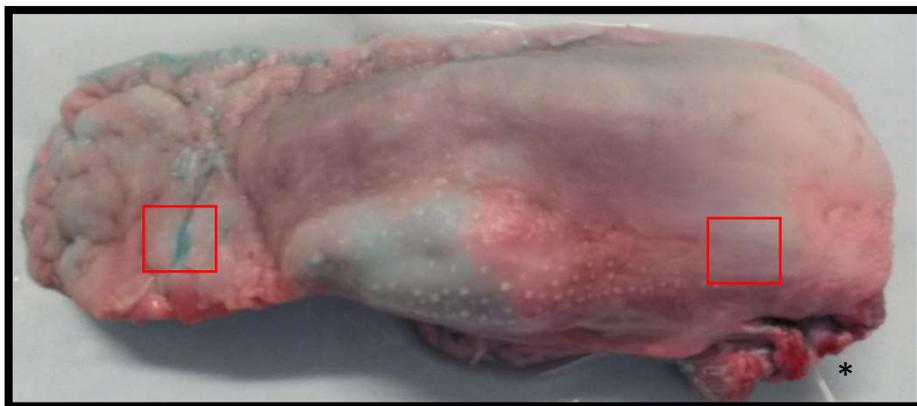


Abbildung 4: Mit Toluidinblau perfundiertes Präparat, das eine nahezu vollständige Anreicherung des Farbstoffs zeigt. Die roten Rechtecke entsprechen den Entnahmestellen für die Gewebeproben im proximalen bzw. distalen Bereich des Transplantates. Konnektionsstelle mit einliegender Kanüle (*). Ansicht von oben.

2.2.3 Inkubation und Extinktionsmessung

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte im S1-Labor. Hier wurde das entnommene Muskelgewebe mit Hilfe eines millimeterskalierten Lineals standardisiert in 3mm^3 große Blöcke geschnitten, gewogen und anschließend im MTS/PMS Assay (s. 2.3.2.1 und Abb. 5) zur Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C und einer CO_2 -Konzentration von 5% für 60 Minuten gelagert. Um die notwendige Inkubationsdauer zu bestimmen, mit der ein Unterschied zwischen vitalem und avitalem Muskelgewebe in der Extinktionsmessung sicher erkennbar und das Extinktionsmaximum des Photometers nicht überschritten wird, ist vor Beginn der Versuchsreihe ein Testlauf durchgeführt worden (s. Tab. 4 und Abb. 6). Hierbei wurde die Extinktion in regelmäßigen Zeitabständen von 15 Minuten über einen Gesamtzeitraum von mehreren Stunden für je eine vitale und eine avitale Gewebeprobe analysiert. Die als vital betrachtete Probe wurde dabei bei Raumluft trocken gelagert. Um die avitale Probe als solche zu klassifizieren, ist diese vor Beginn der Inkubation für 30 Minuten in reines Dimethylsulfoxid (DMSO) gelegt worden, ein weit verbreitetes Lösungsmittel, das bei Raumtemperatur zytotoxische Wirkungen besitzt (Oz, Aydemir, & Fiskin, 2012; Qi, Ding, & Salvi, 2008).

Danach erfolgte die Extinktionsmessung der verfärbten Lösung mithilfe der Photometrie bei 490nm (s. 2.3.2.2). Dafür wurden die Gewebeprobe aus den Küvetten entfernt und diese unverzüglich in das Photometer (BioPhotometer® plus, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Messung eingesetzt. Nach einer vorangegangenen Leerprobe mit einer ohne Muskelgewebe inkubierten MTS/PMS Assay enthaltenen Küvette, wurde dreimal hintereinander die Extinktion an derselben Probe gemessen und der Mittelwert gebildet. Dieser wurde notiert und anschließend mit der nächsten Probe fortgefahren.

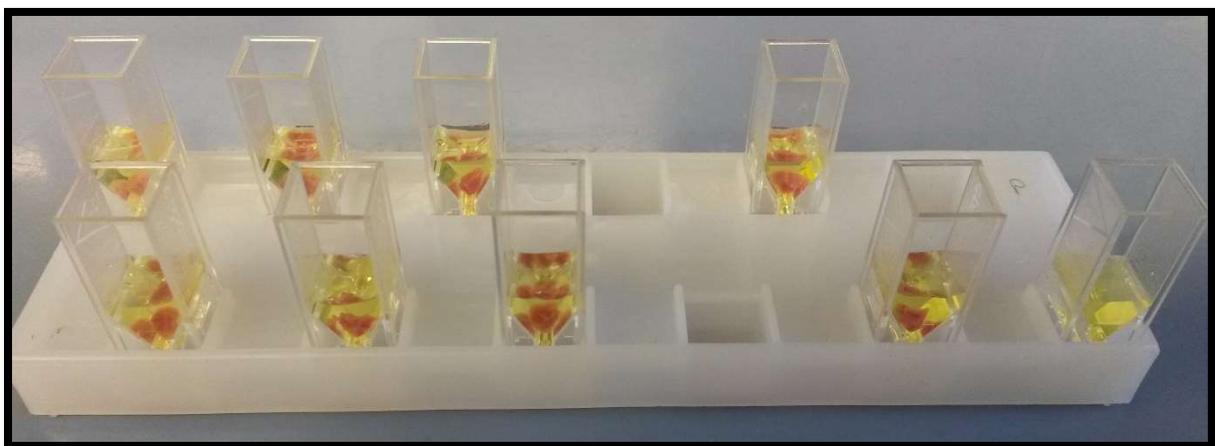


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung von mit Gewebeprobe und MTS/PMS Assay befüllten Küvetten vor Inkubation

Tabelle 4: Testlauf zur Bestimmung der geeigneten Inkubationsdauer der Gewebeprobe. Aufgelistet sind die Extinktionsmessungen in Arbeitseinheiten von je einer vitalen bzw. avitalen Probe zu jeweiligen Messungszeitpunkten nach verschieden langer Inkubationsdauer. +++ entspricht einem oberhalb des Extinktionsmaximums gemessenen Wert.

Messung Nr.	vital	avital	Inkubationsdauer (min.)
1	0,342	0,202	15
2	0,721	0,429	30
3	1,136	0,528	45
4	1,572	0,606	60
5	1,931	0,666	75
6	2,292	0,700	90
7	2,426	0,747	105
8	2,735	0,754	120
9	+++	0,759	135

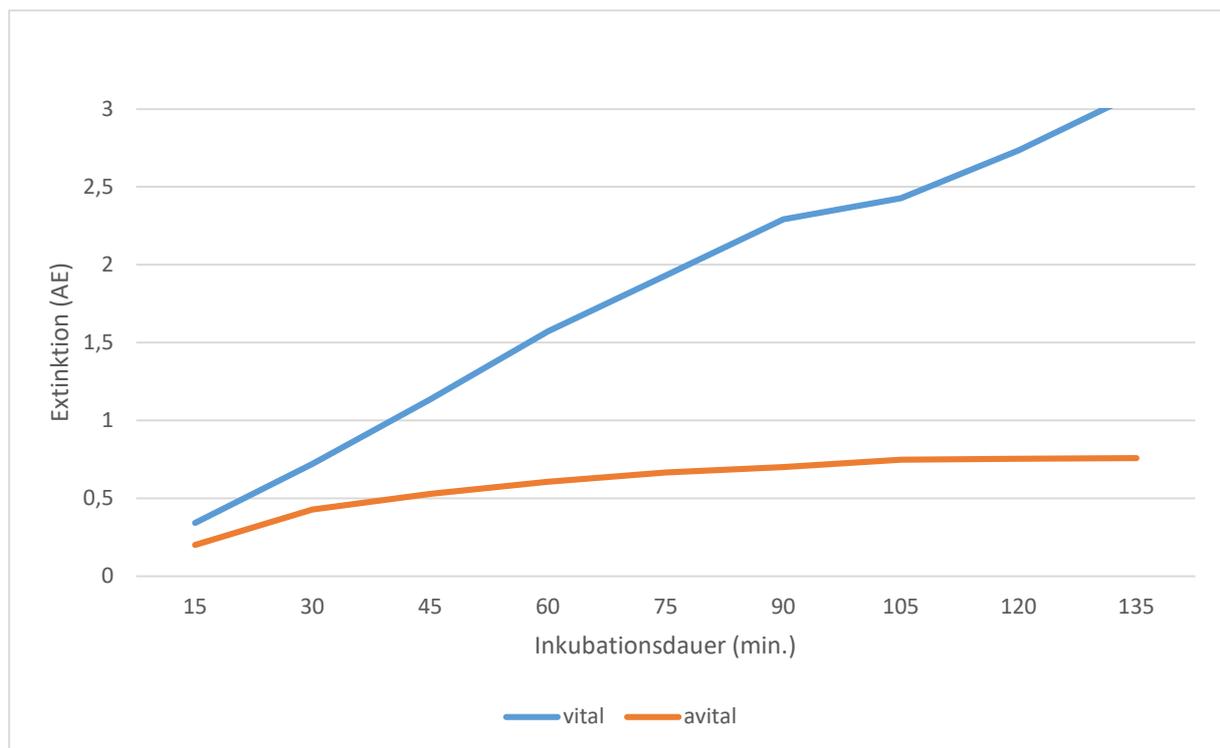
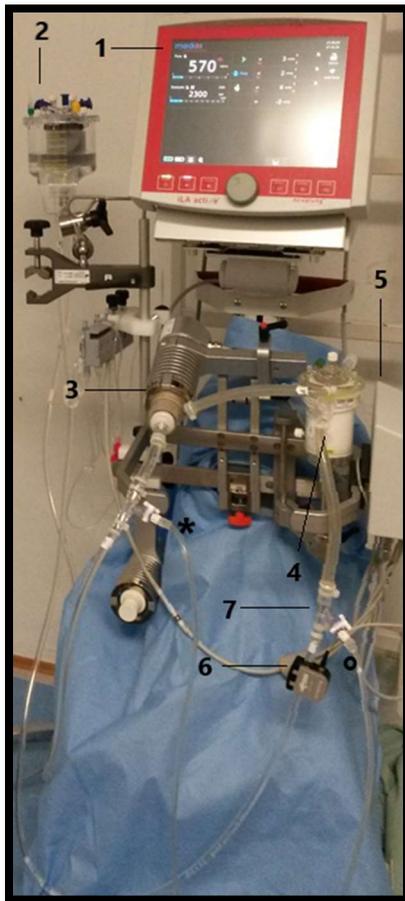


Abbildung 6: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer der Inkubation von vitalen und avitalen Gewebeprobe im Rahmen eines Vorversuchs zur Erfolgskontrolle und Bestimmung einer geeigneten Inkubationsdauer

2.3 Arbeitsmittel

2.3.1 Perfusionssystem

Das grundsätzliche Bauprinzip des Perfusionssystems mit ECMO besteht in einem Membranoxygenator zur Sauerstoffanreicherung und CO₂-Eliminierung sowie einem Antrieb zum Transport des Perfusionsmediums. Verbunden sind diese Bestandteile durch ein Schlauchsystem mit verschiedenen Anschlussmöglichkeiten für zu- und abführende Linien sowie Drucksensoren. Diese können zur Messung und Überwachung des Drucks vor und hinter dem Pumpenantrieb sowie dem Oxygenator nachgeschaltet angebracht werden. Durch die Heparinbeschichtung des aus Polyvinylchlorid (PVC) bestehenden Schlauchsystems, wird die Aktivierung von Gerinnungs- und Entzündungskaskaden wirksam verringert (Moen et al., 1997; Staudinger, 2018). Eine Zentrifugalpumpe mit diagonalem Fluss und magnetischem Antrieb leitet durch tangentielle Beschleunigung und radiale Fliehkraft das flüssige Medium fort. Dabei erfassen Sensoren den Blutfluss, der eine Flussrate von bis zu 8.000ml/min erreichen kann, mithilfe des nicht-invasiven Ultraschall-Transit-Time-Verfahrens. Hierfür werden volumetrische Durchflussraten durch Laufzeitdifferenzen von Ultraschallsignalen in einer Messstrecke mittels Piezo-Keramiken ermittelt. Darüber hinaus können im System zirkulierende Luftblasen ab einer Größe von ca. 0,5mm erfasst werden, die über ein Alarmsystem gemeldet und an verschiedenen Auslassstellen eliminiert werden können. Für die Versuchsdurchführung ist zusätzlich zum standardmäßig benötigtem, ein weiterer dem Präparat direkt vorgeschalteter Flussensor (em-tec GmbH, Finning, Deutschland) zur Anwendung gekommen, der die Durchflussgeschwindigkeit in ml/min kurz vor Eintritt in das Gefäßsystem der Schweinezunge misst. Zur Temperierung der Perfusionslösung dient ein zusätzliches Modul (NovaTherm®, Firma novalung® GmbH, Heilbronn, Deutschland), das über einen separaten Kreislauf im Oxygenator das Perfusionsmedium anwärmen oder abkühlen kann. Dabei können Temperaturen zwischen 15°C und 39°C gewählt werden. Über einen abnehmbaren Touchscreen-Monitor mit zusätzlichem Drehrad und Funktionstasten als Benutzerschnittstelle können verschiedene Parameter eingestellt und angepasst werden. Dazu zählt in erster Linie der Blutfluss, der über die Regulierung der Drehzahl (0-10.000 U/min) variiert wird und entweder kontinuierlich oder pulsatil einstellbar ist. Die mit verschiedenen Anschlussmöglichkeiten ausgestattete Sensorbox verarbeitet und speichert schließlich als zentrale Steuereinheit die gemessenen Daten.



- 1 - Touchscreen-Monitor
- 2 - Reservoir für Perfusionslösung
- 3 - Pumpenantrieb
- 4 - Membranoxygenator
- 5 - Sensorbox
- 6 - Flow-Sensor
- 7 - Schlauchsystem mit zusätzlich angebrachten zu- (*) und abführenden (°) Linien

Abbildung 7: Verwendetes Perfusionssystem der Firma novalung® (modifiziert, s. Legende)

2.3.2 Testverfahren zum Vitalitätsnachweis

Als Testverfahren für einen Vitalitätsnachweis wurde die metabolische Zellaktivität mithilfe des MTS/PMS Assays bestimmt. Der generierte Farbumschlag konnte anschließend durch photometrische Extinktionsmessung numerisch und graphisch dargestellt werden.

2.3.2.1 MTS/PMS Assay

Das MTS/PMS Assay ist eine chemische Untersuchungsmethode beruhend auf einer Redox-Reaktion, deren erstmalige Beschreibung zurückgeht auf Friese, von Pechmann und Runge Ende des 19. Jahrhunderts (Altman, 1976; Ried, 1952; von Pechmann, 1892; von Pechmann & Runge, 1894). Ziel dieser Untersuchungsmethode ist es, die Zellviabilität eines bestimmten Gewebes mithilfe der metabolischen Aktivität einer Zelle zu untersuchen. MTS (Methylthiazolsulfophenyl) steht dabei für ein relativ neuartiges Tetrazoliumsalz, welches im

oxidierten Zustand eine gelbliche Farbe aufweist und nach Reduktion mit zwei Elektronen und einem Proton in das wasserlösliche, blau-violette Formazan umgewandelt wird. Es unterscheidet sich von älteren Generationen durch die dazugewonnene Wasserlöslichkeit des Formazanprodukts (Chen, Fang, Cai, & Guo, 2002; McCluskey, Quinn, & McGrath, 2005). Dehydrogenasen in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle vermitteln dabei diese Redox-Reaktion. PMS (Phenazinmethosulfat) ist ein Redoxindikator, der als Elektronenkoppler Elektronen zu den Tetrazoliumsalsen transferiert. Die Menge des reduzierten Formazans gilt schließlich als Indikator für die metabolische Aktivität der Zelle und ist damit direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Laut angegebenem Protokoll wird für das MTS/PMS Assay ein Mischungsverhältnis von 2ml MTS und 100µl PMS benötigt (Promega, 2012). Zusätzlich wurden jeder Probe in den einzelnen Küvetten 500µl NaCl dazugegeben, um eine vollständige Immersion der Gewebeblöcke im Assay sowie die anschließende Extinktionsbestimmung gewährleisten zu können. Abschließend kann dann nach Inkubation mithilfe der Photometrie (s. 2.3.2.2) der Farbumschlag durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen werden.

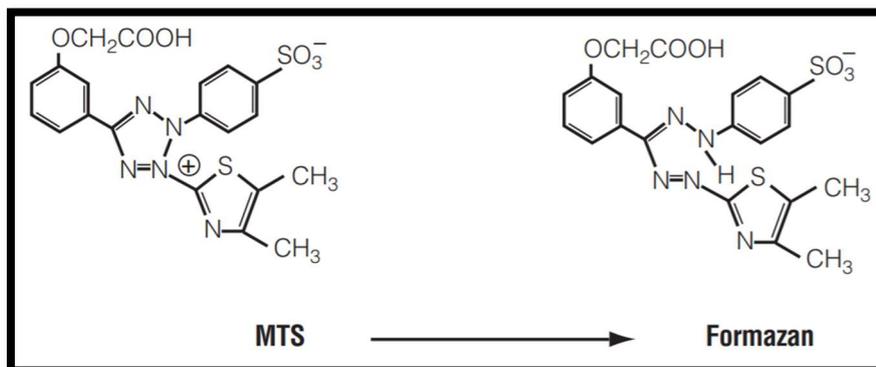


Abbildung 8: Redox-Reaktion mit der Umwandlung von MTS in Formazan (Promega, 2012)

2.3.2.2 Photometrische Extinktionsmessung

Die Photometrie beschreibt ein Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von farbigen Lösungen mithilfe sichtbaren Lichts im Wellenlängenbereich von 750-400nm. Dabei wird durch Transmissionsmessungen die Intensität des durchtretenden Lichts, das von einer definierten Strahlungsquelle abgegeben wird, gemessen. Abhängig von den Absorptionseigenschaften, der Länge des Lichtwegs in der Lösung und der Konzentration variiert die durchtretende Lichtintensität. Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (s. Abb. 9) wird dann die Extinktion als Maß für die Abschwächung der Strahlung berechnet, die wiederum proportional zur Konzentration der Lösung ist.

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Abbildung 9: Lambert-Beer'sches Gesetz

I = Intensität des transmittierten Lichts, I_0 = Intensität des einfallenden Lichts,
 ϵ_{λ} = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Länge des Lichtwegs, E_{λ} = Extinktion (dimensionslose Größe)



Abbildung 10: Verwendetes BioPhotometer® der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte zunächst im Einzelnen zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Vitalitätswerte prozentual zum jeweiligen Ausgangswert.

Die weitere statistische Analyse wurde mithilfe von SPSS Version 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) sowie der R Version 4.0.3 durchgeführt. Vorab wurden alle nicht-nominalen Daten hinsichtlich ihrer Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests untersucht.

Anschließend wurden statistische Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen unter Anwendung des t-Tests und der einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Für die Modellfindung wurde ein schrittweises Vorgehen gewählt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Versuchsdurchführungen wurden für jede der untersuchten Perfusionslösungen jeweils zwölf Schweinezungen an das Perfusionssystem angeschlossen und für acht Stunden perfundiert. Zur Vitalitätskontrolle wurde bei jedem der Präparate zu Beginn, nach vier Stunden und nach acht Stunden Gewebeproben entnommen. Hierfür wurden standardisiert Proben an den jeweils korrespondierenden Stellen sowohl im proximalen Drittel als auch im distalen Drittel der Schweinezunge entnommen, sodass pro Präparat insgesamt sechs Proben untersucht worden sind. Zur Standardisierung wurden für alle Präparate gleiche Abstände von der Zungenspitze bzw. von den Papillae vallatae zur Entnahmestelle festgelegt (s. auch Abb. 4, S. 13). Das gleiche Verfahren ist für eine Vergleichsgruppe von ebenfalls zwölf Schweinezungen angewandt worden, die nicht perfundiert bei Raumtemperatur gelagert worden sind.

3.1 Allgemeine Parameter

Neben den entnommenen Gewebeproben sind vor und während der Versuchsdurchführungen verschiedene Parameter gemessen worden, die einen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse und deren Interpretation haben könnten.

3.1.1 Gewicht

Zu diesen gemessenen Parametern zählt das Gewicht der Schweinezungen, welches nach Kürzen im Bereich der Papillae vallatae erhoben wurde. Die Präparate wogen zwischen 111g und 209g. Im Durchschnitt betrug das Gewicht aller Präparate ca. 159g (s. Tab. 5 und Abb. 11).

Tabelle 5: Gewicht in g der einzelnen Schweinezungen unterteilt zur jeweiligen Versuchsgruppe vor Beginn der Versuchsdurchführungen

Präparat-Nr.	NaCl	DMEM	UW Lösung	Nicht perfundiert
1	145	148	192	188
2	113	145	167	147
3	156	111	199	177
4	134	186	185	180
5	159	186	112	172
6	168	175	117	123
7	191	172	117	123
8	128	194	149	134
9	209	178	160	153
10	196	198	195	184
11	198	167	120	134
12	161	144	134	124

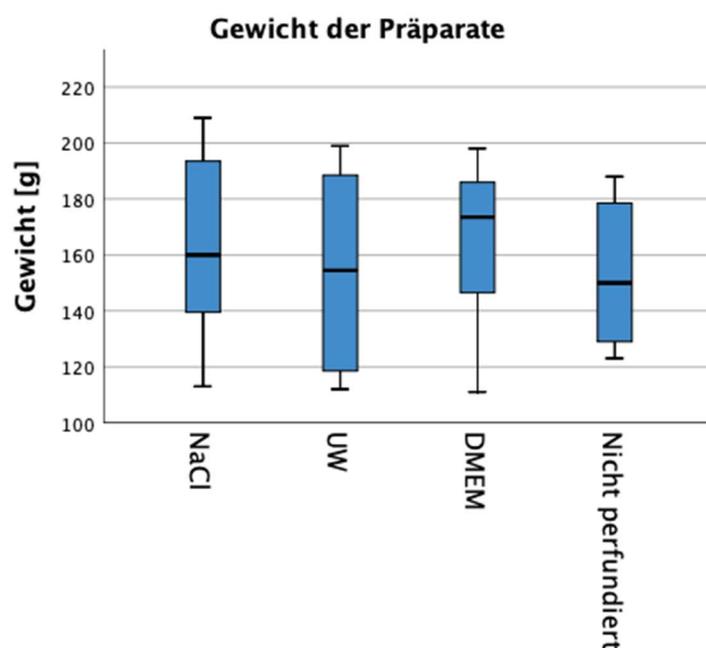


Abbildung 11: Gewicht der Präparate veranschaulicht im Box-Plot Diagramm

3.1.2 Flow

Der Flow, also die Durchflussgeschwindigkeit pro Minute, wurde mithilfe von Ultraschallsensoren in der zum Präparat führenden Linie kurz vor der Konnektionsstelle von PVK und A. lingualis gemessen. Er ergab sich durch die variierbare Drehzahl der Pumpe als Regulationsmöglichkeit sowie durch den gegebenen Gefäßwiderstand im Präparat selbst. Er betrug zwischen 2 und 12ml/min und belief sich durchschnittlich auf ca. 5,5ml/min (s. Tab. 6 und Abb. 12).

Tabelle 6: Durchschnittliche Durchflussgeschwindigkeiten in ml/min während der einzelnen Versuchsdurchführungen

Präparat-Nr.	NaCl	DMEM	UW Lösung
1	10	6,5	6,5
2	12	3,5	4
3	6	6,5	3,5
4	4	9	8
5	5	2,5	4
6	6	2,5	9
7	4	4	8
8	9	5	3
9	8	8	2
10	4	2	5
11	3	2	4
12	8	3	6

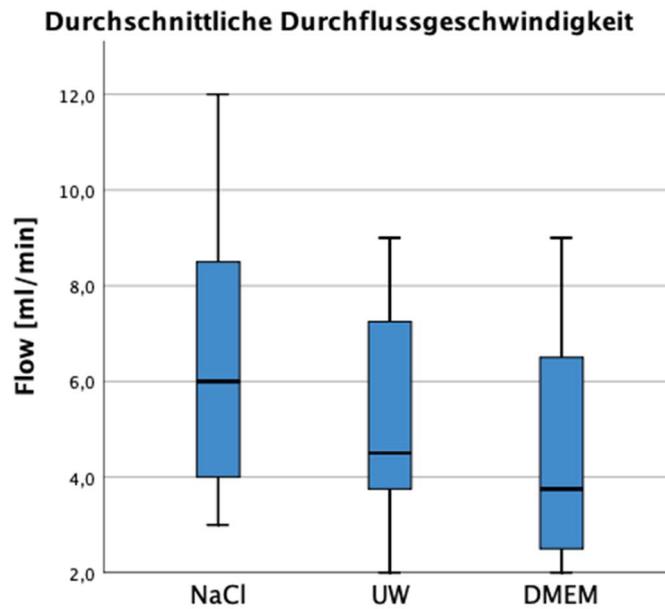


Abbildung 12: Durchflussgeschwindigkeiten der angewandten Perfusionslösungen veranschaulicht im Box-Plot Diagramm

3.1.3 Weitere Parameter

Mithilfe von Drucksensoren wurde ein durchschnittlicher Druck von ca. 69mmHg im Kreislauf gemessen. Die Temperatur wurde mithilfe eines separaten Kreislaufs eines Temperiermoduls (NovaTherm®, Firma novalung® GmbH, Heilbronn, Deutschland) auf 37°C gehalten. Die Drehzahl variierte je nach notwendiger Höhe, um einen Flow von durchschnittlich 5-6ml/min im Präparat zu erreichen. Die Ischämiezeit, gemessen nach Schlachtung der Tiere bis zum Anschluss der Schweinezungen an das Perfusionssystem, betrug im Durchschnitt circa 90 Minuten (+/- 30 Minuten).

3.2 Einzelauswertungen

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Versuchsdurchführungen im Einzelnen sowie anschließend im Vergleich zueinander dargestellt.

3.2.1 University of Wisconsin Lösung

Die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben im proximalen Bereich lag durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,718, nach 240 Minuten bei 1,187 und nach 480 Minuten bei 1,181. Daraus ergibt sich eine Reduktion der gemessenen Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 69,1% und nach 480 Minuten auf ca. 68,7% des Ausgangswertes.

Im distalen Bereich lag die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,255, nach 240 Minuten bei 0,965 und nach 480 Minuten bei 0,883. Hier reduzierte sich die ermittelte Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 76,9% und nach 480 Minuten auf ca. 70,4% des Ausgangswertes.

Nach 240 Minuten ergab sich also im proximalen Bereich ein Extinktionsverlust von 30,9%, im distalen Bereich von 23,1%. Nach weiteren 240 Minuten fiel die gemessene Extinktion proximal erneut um 0,4%, distal um 6,5%, sodass sich nach insgesamt 480 Minuten ein Extinktionsverlust im proximalen Bereich von ca. 31,3% und im distalen Bereich von ca. 29,6% ergab (s. Tab. 7 und Abb. 13).

Tabelle 7: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit UW Lösung

Lokalisation	proximal			distal		
	Zeitpunkt					
Präparat-Nr.	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	1,340	1,112	1,142	0,650	0,472	0,524
2	2,043	1,430	1,243	1,428	1,065	1,204
3	2,003	1,526	1,666	1,544	1,397	1,411
4	2,855	1,750	1,659	1,626	1,178	1,013
5	1,071	0,619	0,729	0,971	0,651	0,766
6	2,163	1,307	1,540	1,516	1,016	1,018
7	0,601	0,523	0,851	0,786	0,756	0,611
8	0,921	0,661	0,325	0,381	0,301	0,144
9	2,375	1,934	1,629	1,827	1,440	0,730
10	1,844	1,122	1,150	1,487	1,246	1,174
11	1,973	1,320	1,277	1,566	1,080	1,059
12	1,430	0,945	0,963	1,280	0,983	0,942
Mittelwert	1,718	1,187	1,181	1,255	0,965	0,883

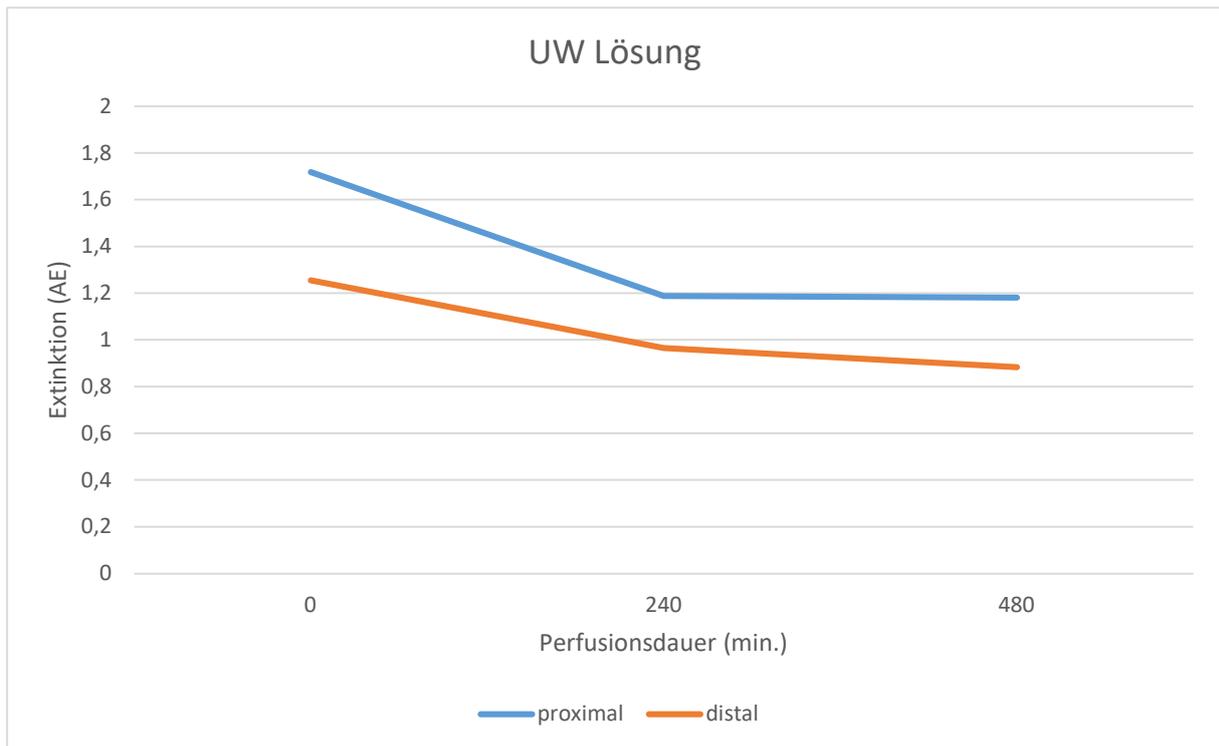


Abbildung 13: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit UW Lösung

3.2.2 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nährlösung

Die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben im proximalen Bereich lag durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 2,076, nach 240 Minuten bei 1,319 und nach 480 Minuten bei 1,168. Daraus ergibt sich eine Reduktion der gemessenen Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 63,5% und nach 480 Minuten auf ca. 56,3% des Ausgangswertes.

Im distalen Bereich lag die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,683, nach 240 Minuten bei 1,340 und nach 480 Minuten bei 1,238. Hier reduzierte sich die ermittelte Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 79,6% und nach 480 Minuten auf ca. 73,6% des Ausgangswertes.

Nach 240 Minuten ergab sich also im proximalen Bereich ein Extinktionsverlust von 36,5%, im distalen Bereich von 20,4%. Nach weiteren 240 Minuten fiel die gemessene Extinktion proximal erneut um 7,2%, distal um 6%, sodass sich nach insgesamt 480 Minuten ein Extinktionsverlust im proximalen Bereich von ca. 43,7% und im distalen Bereich von ca. 26,4% ergab (s. Tab. 8 und Abb. 14).

Tabelle 8: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit DMEM Nährlösung

Lokalisation	proximal			distal		
	Zeitpunkt	T0	T1	T2	T0	T1
Präparat-Nr.	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	2,507	1,628	1,094	1,939	1,388	1,446
2	2,147	1,705	1,180	2,195	1,336	0,997
3	2,192	1,538	1,122	1,906	1,018	0,844
4	1,824	1,195	1,256	1,162	0,880	0,737
5	2,990	1,348	1,248	1,258	1,180	1,325
6	2,053	1,308	1,408	2,144	1,475	1,210
7	1,751	1,075	1,129	1,370	1,416	1,918
8	2,069	1,595	1,489	1,867	2,091	1,818
9	1,599	1,366	1,262	1,626	1,439	1,404
10	1,357	0,860	0,716	1,589	0,784	0,437
11	2,234	1,324	1,123	2,150	2,074	1,543
12	2,183	0,882	0,989	0,991	0,995	1,182
Mittelwert	2,076	1,319	1,168	1,683	1,340	1,238

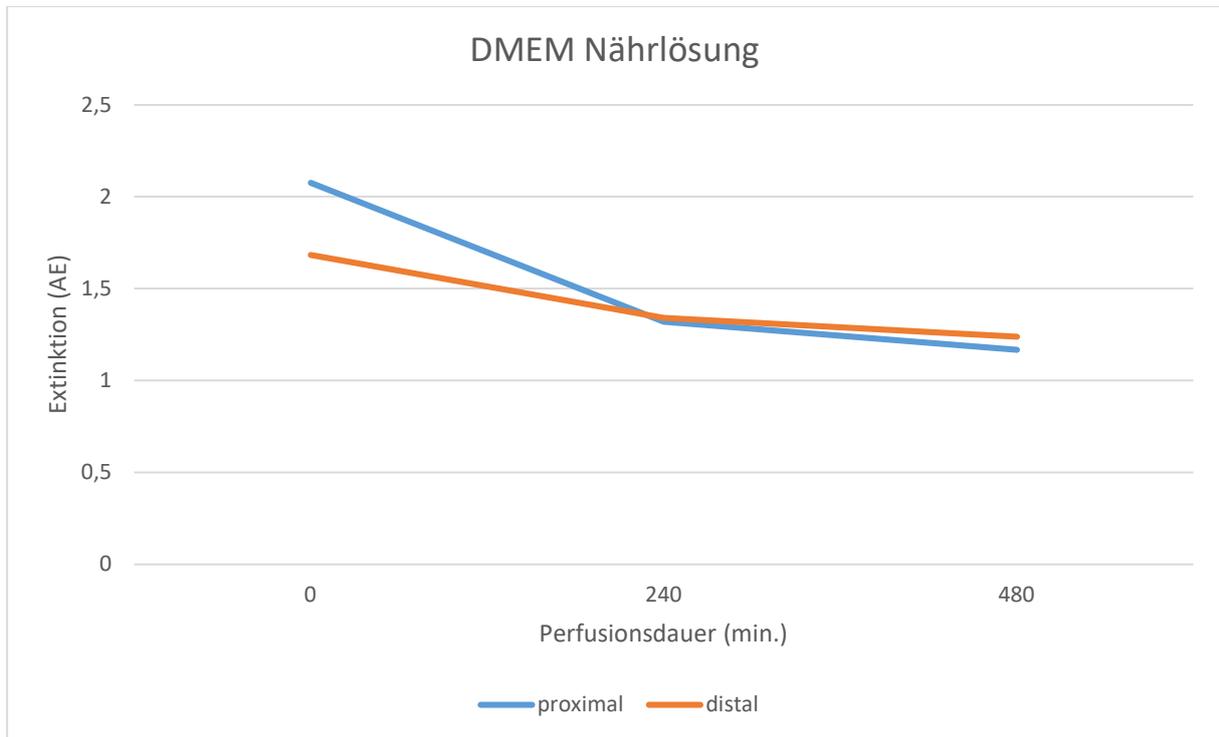


Abbildung 14: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit DMEM Nährlösung

3.2.3 Natriumchlorid

Die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben im proximalen Bereich lag durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,714, nach 240 Minuten bei 1,208 und nach 480 Minuten bei 0,914. Daraus ergibt sich eine Reduktion der gemessenen Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 70,4% und nach 480 Minuten auf ca. 53,3% des Ausgangswertes.

Im distalen Bereich lag die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,495, nach 240 Minuten bei 1,299 und nach 480 Minuten bei 1,214. Hier reduzierte sich die ermittelte Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 86,9% und nach 480 Minuten auf ca. 81,2% des Ausgangswertes.

Nach 240 Minuten ergab sich also im proximalen Bereich ein Extinktionsverlust von 29,6%, im distalen Bereich von 13,1%. Nach weiteren 240 Minuten fiel die gemessene Extinktion proximal erneut um 17,1%, distal um 5,7%, sodass sich nach insgesamt 480 Minuten ein Extinktionsverlust im proximalen Bereich von ca. 46,7% und im distalen Bereich von ca. 18,8% ergab (s. Tab. 9 und Abb. 15).

Tabelle 9: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit NaCl

Lokalisation	proximal			distal		
Zeitpunkt						
Präparat-Nr.	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	3	1,972	2,035	2,491	2,087	1,948
2	3	2,481	1,826	2,555	2,321	2,126
3	1,551	1,037	0,795	1,709	0,704	0,908
4	2,108	1,182	0,350	1,765	1,183	0,843
5	1,556	0,981	0,314	1,397	1,366	1,306
6	0,943	0,792	0,732	1,283	1,863	1,935
7	1,706	1,310	1,157	1,821	1,227	1,553
8	2,179	1,268	0,860	0,827	1,588	1,129
9	0,920	0,812	0,567	0,752	0,747	0,488
10	0,700	0,591	0,583	1,141	0,738	0,343
11	0,925	0,673	0,510	0,846	0,838	1,112
12	1,981	1,399	1,244	1,357	0,922	0,880
Mittelwert	1,714	1,208	0,914	1,495	1,299	1,214

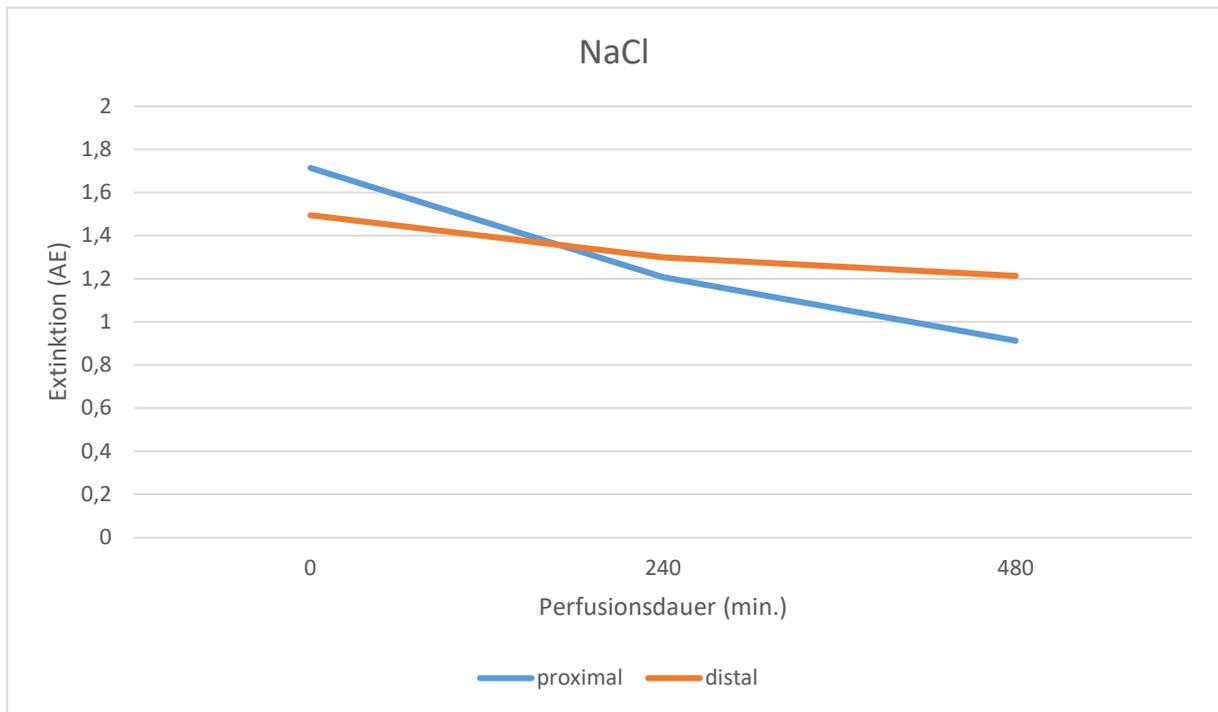


Abbildung 15: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit NaCl

3.2.4 Nicht perfundiert

Die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben im proximalen Bereich lag durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,781, nach 240 Minuten bei 1,287 und nach 480 Minuten bei 1,004. Daraus ergibt sich eine Reduktion der gemessenen Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 72,3% und nach 480 Minuten auf ca. 56,4% des Ausgangswertes.

Im distalen Bereich lag die ermittelte Extinktion aus den Gewebeproben durchschnittlich zu Beginn der Perfusion bei 1,362, nach 240 Minuten bei 1,154 und nach 480 Minuten bei 1,025. Hier reduzierte sich die ermittelte Extinktion nach 240 Minuten auf ca. 84,7% und nach 480 Minuten auf ca. 75,3% des Ausgangswertes.

Nach 240 Minuten ergab sich also im proximalen Bereich ein Extinktionsverlust von 27,7%, im distalen Bereich von 15,3%. Nach weiteren 240 Minuten fiel die gemessene Extinktion proximal erneut um 15,9%, distal um 9,4%, sodass sich nach insgesamt 480 Minuten ein Extinktionsverlust im proximalen Bereich von ca. 43,6% und im distalen Bereich von ca. 24,7% ergab (s. Tab. 10 und Abb. 16).

Tabelle 10: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) ohne jegliche Perfusion

Lokalisation	proximal			distal		
	Zeitpunkt					
Präparat-Nr.	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	2,542	1,614	1,244	2,349	1,630	1,115
2	0,413	0,465	0,291	0,321	0,248	0,287
3	1,667	1,219	1,124	1,235	1,027	1,025
4	1,716	1,044	0,756	0,720	0,417	0,334
5	1,783	1,529	1,097	1,853	1,700	1,234
6	2,079	1,997	2,062	1,981	1,961	2,011
7	2,691	1,401	1,059	1,682	0,984	0,810
8	2,015	1,717	1,221	1,695	1,627	1,035
9	1,511	1,193	1,346	1,476	1,655	1,601
10	1,867	1,078	0,865	0,706	0,810	0,852
11	1,462	1,175	0,464	1,814	1,457	1,749
12	1,622	1,008	0,524	0,517	0,327	0,243
Mittelwert	1,781	1,287	1,004	1,362	1,154	1,025

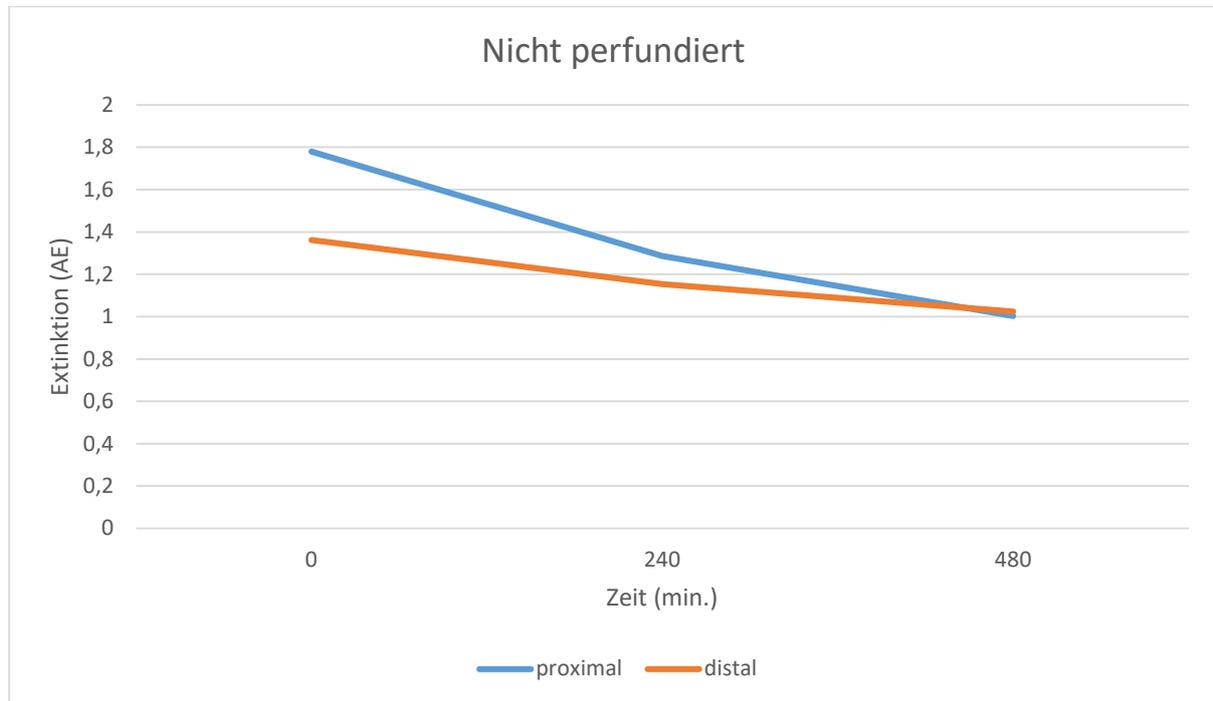


Abbildung 16: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Lagerung bei Raumtemperatur

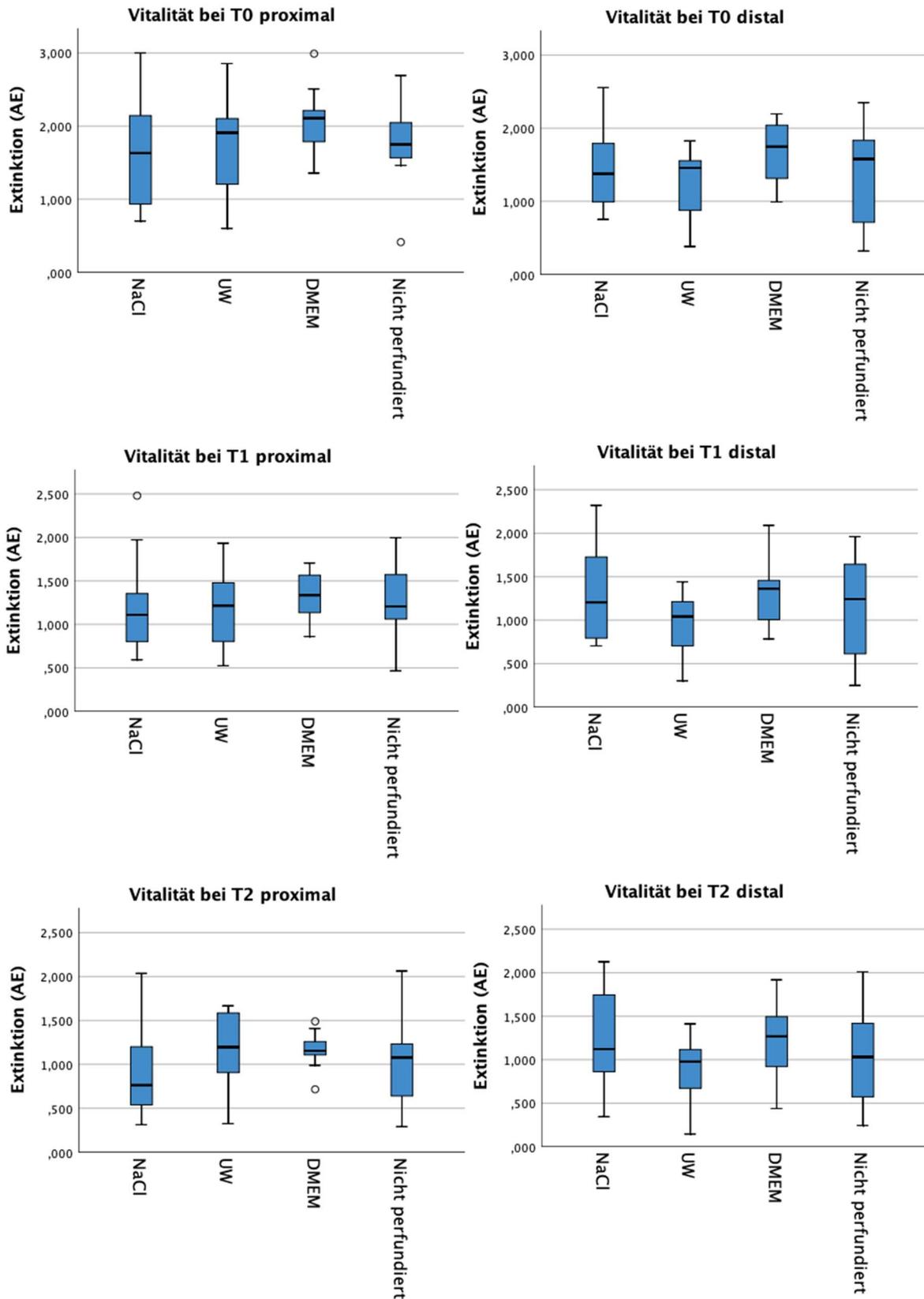


Abbildung 17: Übersichtsabbildung zur ermittelten Extinktion der jeweiligen Versuchsgruppen veranschaulicht in Box-Plot Diagrammen. Vergleichend sind die Vitalitätswerte in proximalen Bereichen zu den untersuchten Zeitpunkten T0, T1 und T2 den jeweils korrespondierenden Zeitpunkten in distalen Bereichen gegenübergestellt.

3.3 Weitergehende statistische Analyse

Zur Überprüfung, ob eine Normalverteilung der Werte vorliegt, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt (s. Tab. 11) sowie anschließend die einfaktorielles Varianzanalyse bei zugrunde liegender Normalverteilung (s. Tab. 12). Mittels t-Test wurden dann die Vitalitätswerte zwischen proximalen und distalen Proben untersucht (s. Tab. 13 - 17).

Tabelle 11: Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung

0 = NaCl, 1 = UW Lösung, 2 = DMEM Nährlösung, 3 = Nicht perfundiert, T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz

	Perfusions- lösung	T	DF	p
T0p (0min., proximal)	0	,172	12	,200
	1	,159	12	,200
	2	,188	12	,200
	3	,207	12	,167
T1p (240min., proximal)	0	,198	12	,200
	1	,131	12	,200
	2	,151	12	,200
	3	,159	12	,200
T2p (480min., proximal)	0	,206	12	,171
	1	,139	12	,200
	2	,188	12	,200
	3	,153	12	,200
T0d (0min., distal)	0	,148	12	,200
	1	,233	12	,071
	2	,172	12	,200
	3	,188	12	,200
T1d (240min., distal)	0	,167	12	,200
	1	,186	12	,200
	2	,206	12	,170
	3	,202	12	,191
T2d (480min., distal)	0	,144	12	,200
	1	,151	12	,200
	2	,115	12	,200
	3	,137	12	,200
Flow	0	,166	12	,200
	1	,212	12	,141
	2	,172	12	,200
Gewicht	0	,153	12	,200
	1	,177	12	,200
	2	,167	12	,200
	3	,190	12	,200

Tabelle 12: Übersichtstabelle zur Varianzanalyse ohne Ermittlung einer Signifikanz zwischen den Gruppen. Angegeben sind die Mittelwerte der Extinktionswerte sowie die Referenzbereiche in Klammern. T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min., p = Signifikanz

Variable	Messpunkt	NaCl	UW Lösung	DMEM Nährlösung	Nicht perfundiert	p	
Zeitpunkt	T0	Proximal	1,714 [1,219-2,209]	1,718 [1,302-2,134]	2,076 [1,805-2,345]	1,781 [1,414-2,147]	0,442
		Distal	1,495 [1,114-1,877]	1,255 [0,969-1,541]	1,683 [1,420-1,946]	1,362 [0,948-1,778]	0,253
	T1	Proximal	1,208 [0,858-1,558]	1,187 [0,904-1,471]	1,319 [1,142-1,495]	1,287 [1,033-1,540]	0,858
		Distal	1,299 [0,944-1,653]	0,965 [0,740-1,191]	1,340 [1,075-1,604]	1,154 [0,772-1,535]	0,250
	T2	Proximal	0,914 [0,562-1,267]	1,181 [0,917-1,445]	1,168 [1,042-1,293]	1,004 [0,702-1,306]	0,366
		Distal	1,214 [0,848-1,581]	0,883 [0,663-1,103]	1,238 [0,962-1,515]	1,025 [0,662-1,388]	0,256
	Flow (ml/min)		6,583 [4,797-8,369]	5,250 [3,833-6,667]	4,542 [3,000-6,083]	-	0,143
	Gewicht (g)		163,17 [143,82-182,51]	153,92 [132,59-175,25]	167,00 [150,82-183,18]	153,25 [136,94-169,56]	0,578

Tabelle 13: t-Test bei allen Gruppen (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min.
T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler

Zeit	T	DF	p	MD	SE	95% Konfidenzintervall	
						Untere	Obere
T0	3,129	94	,002	,373125	,119	,136	,609
T1	,647	94	,519	,060896	,094	-,125	,247
T2	-,242	94	,809	-,023083	,095	-,212	,166

Tabelle 14: t-Test bei Gruppe „NaCl“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min.
T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler

Zeit	T	DF	p	MD	SE	95% Konfidenzintervall	
						Untere	Obere
T0	2,130	22	,045	,710	,333	-,019	1,401
T1	-,400	22	,693	-,091	,226	-,559	,379
T2	-1,299	22	,208	-,299	,231	-,778	,179

Tabelle 15: t-Test bei Gruppe „UW Lösung“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min.
 T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler

Zeit	T	DF	p	MD	SE	95% Konfidenzintervall	
						Untere	Obere
T0	2,019	22	,046	,463	,229	-,012	,939
T1	1,348	22	,191	,222	,165	-,119	,563
T2	1,908	22	,070	,298	,156	-,025	,622

Tabelle 16: t-Test bei Gruppe „DMEM Nährlösung“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min.
 T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler

Zeit	T	DF	p	MD	SE	95% Konfidenzintervall	
						Untere	Obere
T0	2,291	22	,032	,392	,171	,037	,748
T1	-,145	22	,886	-,021	,144	-,3201	,279
T2	-,511	22	,615	-,070	,138	-,356	,216

Tabelle 17: t-Test bei Gruppe „Nicht perfundiert“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min.
 T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler

Zeit	T	DF	p	MD	SE	95% Konfidenzintervall	
						Untere	Obere
T0	1,665	22	,110	,418250	,251241	-,102792	,939292
T1	,640	22	,529	,133083	,207867	-,298006	,564172
T2	-,094	22	,926	-,020250	,214407	-,464904	,424404

4 Diskussion

4.1 Material und Methodik

4.1.1 Pilotcharakter der angewandten Methodik

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Versuchsaufbau sowie die angewandte Methodik ist nach unserem Wissen in dieser Form noch nie durchgeführt worden. Zwar wurde die Idee der extrakorporalen Perfusion mit Blutersatzlösungen neben anderen bereits 1991 von Kreidstein et al. beschrieben (Kreidstein, Pang, Levine, & Knowlton, 1991). Die Perfusion eines reinen Muskeltransplantates über einen Zeitraum von acht Stunden mithilfe einer Pumpvorrichtung zur extrakorporalen Membranoxygenierung unter Anwendung der o.g. Perfusionslösungen ist ebenso und insbesondere in Kombination mit der Anwendung des MTS/PMS Assays zur Vitalitätsprobe der Muskulatur ein Novum.

Aufgrund der neuartigen Vorgehensweise ist deshalb vor Beginn der Versuchsdurchführungen ein standardisiertes Protokoll entworfen worden, um möglichst zuverlässige, vergleich- und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Zusätzlich sind mehrere Probeversuche zur praktischen Durchführbarkeit vorgenommen worden, sodass ein reibungsloser Ablauf garantiert werden konnte. Der folgende Abschnitt widmet sich der Methodik und diskutiert darüber hinaus verschiedene Eigenschaften der verwendeten Arbeitsmittel.

4.1.2 Praktikabilität, Komplikationen und Fehlerquellen

Trotz einer genauen Planung sind im Verlauf der Versuchsdurchführungen vereinzelt Probleme aufgetreten und mögliche Fehlerquellen ersichtlich geworden. Im Folgenden werden diese benannt und bezüglich ihres Einflusses auf die Ergebnisse der Studie bewertet sowie der Ablauf der Experimente und deren Praktikabilität diskutiert.

Der Aufbau und die Inbetriebnahme der ECMO-Einheit sowie das Befüllen des Schlauchsystems waren zeitlich der aufwendigste Teil. Dies wurde ausnahmslos bereits vor Abholung der Präparate vom Schlachthof vorgenommen, damit ein zeitlich nahtloser Übergang zum Anschluss der Schweinezungen an das System erfolgen und die Ischämiezeit möglichst kurzgehalten werden konnte. Die Probenentnahme, Inkubation und anschließende Photometrie konnten problemlos und ohne Zeitverzögerungen durchgeführt werden aufgrund des räumlich direkt benachbarten S1-Labors mit den darin vorhandenen Gerätschaften.

Vorbereitung und Transport verliefen weitestgehend problemlos. Vereinzelt kam es aufgrund eines erhöhten Verkehrsaufkommens zu geringfügigen Verzögerungen beim Transport der Präparate ohne nennenswerten Zeitverlust. Im Rahmen der vorbereitenden Maßnahmen wurden die Präparate klinisch kontrolliert. Dabei fielen fast regelmäßig Schleimhautlazerationen sowie Schnittwunden auf, die während des Schlachtvorgangs und der Abfertigung zufällig zugeführt worden sind. Einige der Präparate mussten wegen weitreichenden Verletzungen verworfen werden, kleinere und oberflächliche Schnittwunden wurden toleriert, Fehlerquellen ergaben sich dadurch nicht. Nach Anschluss des Schlauchsystems an die A. lingualis wurde mit Hilfe eines Flowmeters die Durchflussrate im unmittelbar vorgeschalteten Schlauchsegment gemessen. Vereinzelt zeigten sich hier vom Durchschnitt deutlich nach unten oder oben abweichende Flussraten. Diese waren auf thromboembolisch verschlossene distale Gefäßanteile, die eine Stase im Gefäß hervorriefen, zurückzuführen. Bei zu hohen Flussraten war die Ursache dagegen eine proximal gelegene Gefäßverletzung mit Austritt der Perfusionslösung direkt ins Flüssigkeitsreservoir. Lösungsansätze für diese Problematik waren das geringfügige Kürzen des Zungenkörpers entweder im distalen Segment, sodass wieder eine adäquate Durchflussrate durch Entfernen der verschlossenen Gefäßabschnitte erreicht werden konnte. Umgekehrt konnte durch Kürzen im proximalen Segment und Readaptation des Schlauchsystems der verletzte Gefäßabschnitt entfernt und somit das vorzeitige Austreten der Perfusionslösung verhindert werden. Bei ausbleibender Anpassung der Flussraten trotz o.g. Lösungsansätze wurde die Versuchsdurchführung mit dem Präparat abgebrochen. Bereits erhobene Werte flossen dann nicht mit in die Ergebnisse mit ein.

Für die Vitalitätsmessung wurden die entnommenen Gewebeproben in 3mm^3 große Stücke zugeschnitten. Dies gelang problemlos. Neben der einheitlichen Oberfläche sollte auch ein einheitliches Volumen der in Würfelform zugeschnittenen Gewebeproben sichergestellt werden, sodass zusätzlich Gewichtskontrollen vorgenommen worden sind. Da es allerdings, bedingt durch ödematöse Auftreibung der Muskulatur während der Perfusion, hierbei durchaus zu Verzerrungen von Volumen und dazu korrespondierender Dichte gekommen sein kann, sind Fehlerquellen bezüglich der untersuchten Muskelmasse möglich. Dadurch könnten sich auch im Verlauf der weiteren Versuchsdurchführungen Messungenauigkeiten bei der Photometrie und letztlich dem daraus angenommenen Grad der Vitalität ergeben haben.

4.1.3 *Arbeitsmittel*

Die Vitalerhaltung von Geweben mittels extrakorporaler, maschineller Perfusion unter Anwendung von Perfusionslösungen ist in der Transplantationsmedizin ein bereits seit längerem bekanntes und erprobtes Verfahren (s. Abschnitt 1.2.3.1). In einigen Studien erwies es sich sogar der Standardmethodik, also der hypothermen Organkonservierung, als überlegen in Bezug auf das Organüberleben und die Komplikationsraten (Moers et al., 2009; Schold et al., 2005; J. Wight, J. Chilcott, M. Holmes, & N. Brewer, 2003; J. P. Wight, J. B. Chilcott, M. W. Holmes, & N. Brewer, 2003). Ein Grund hierfür könnte unter anderem ein protektiver Mechanismus auf das Gefäßsystem der maschinell perfundierten Organe sein (Quante & Tullius, 2015). Untersuchungen zeigten, dass der endotheliale Transkriptionsfaktor Kruppel-like Factor 2 (KLF2) eine entscheidende Schlüsselrolle für die vaskuläre Homöostase spielt. Dabei führt die erzeugte Scherspannung in Gefäßwänden durch maschinelle, pulsatile Perfusion zur Produktion o.g. Transkriptionsfaktors. Eine fehlende Expression von KLF2 führt dagegen zu einer raschen Induktion von pro-inflammatorischen und letztlich thrombotischen Vorgängen ausgehend vom Endothel (Quante & Tullius, 2015). Weitere Belege für einen protektiven Mechanismus der pulsatilen Perfusion ergeben sich durch Untersuchungen von Timsit et al. Hierbei wurden humane Tubulus-Epithelzellen der Niere über einen Zeitraum von 24 Stunden laminaren Scherspannungen in einem in-vitro Modell ausgesetzt. Es zeigte sich, dass dies nicht nur zu einer Hochregulation vom Transkriptionsfaktor KLF2 führte. Auch die mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Zytokinen zeigte einen signifikanten Rückgang, wobei insbesondere die Suppression von Interleukin 8 (IL-8) mit einer Hochregulation von KLF2 zusammenhing (Timsit et al., 2013).

Auch die bereits anfangs erwähnte normotherme Perfusion stellt eine mögliche Verbesserung der Organkonservierung und Vitalerhaltung von Geweben dar. Nicholson et al. konnten in einer Studie zur Nierentransplantation zeigen, dass die Notwendigkeit einer Dialysepflichtigkeit aufgrund einer verspätet einsetzenden Funktionstüchtigkeit der transplantierten Organe bei solchen geringer war, die vorher mithilfe einer extrakorporalen normothermen Perfusion behandelt wurden, als jene, die dem aktuellen Standardprozedere der statischen hypothermen Organkonservierung unterzogen wurden (Nicholson & Hosgood, 2013). Ebenso konnte in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden, dass im klinischen Kontext von Lungentransplantationen die normotherme ex-vivo-Perfusion von vorgeschädigten und deshalb nicht für die Verpflanzung geeigneten Organen,

Reparaturprozesse fördern und somit auch die Funktion jener Organe verbessern konnte, sodass diese für die Transplantation verwendbar wurden (Cypel et al., 2011; Quante & Tullius, 2015). Aufgrund des ausgeprägten Organmangels für Transplantationszwecke, wurden in einer anderen interessanten Untersuchung humane Spenderherzen, also einem aus hauptsächlich Muskelgewebe bestehendem Transplantat, wie es auch in dieser Studie als Schweinezunge verwendet wurde, vor der Transplantation einer normothermen Maschinenperfusion unterzogen. Ziel war es hierbei auch, Organe für die Transplantation zu generieren, die aufgrund strenger Ausschlusskriterien für eine Transplantation abgelehnt werden. Ergebnisse zeigten, dass die für durchschnittlich circa 4,5 Stunden bei 34°C perfundierten Spenderherzen in über 90% eine gute Funktion erzielten (Garcia Saez et al., 2014). Schlussfolgernd könnte die normotherme Perfusion durch die deutlich verbesserte Transplantatfunktion bei Hochrisiko-Empfängern oder eben jenen Transplantaten, die aufgrund der aktuell gängigen Kriterien für eine Transplantation abgelehnt werden, demnach nach Ansicht der Autoren zu einem Anstieg erfolgreicher Herztransplantationen führen. Dem verstellbaren pulsatilem Flussmuster bei normothermen Bedingungen im Rahmen der maschinellen extrakorporalen Perfusion, wie er auch in dieser Studie zur Anwendung gekommen ist, kommt der Vitalerhaltung von Geweben somit eine entscheidende Bedeutung zu.

Das in dieser Arbeit genutzte MTS/PMS Assay in Verknüpfung mit der Photometrie als Untersuchungsmethode zur Vitalitätsmessung von Zellen ist ein gängiges Verfahren in der experimentellen Forschung. Anwendung findet es besonders bei enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA), die mit Mikrotiterplatten, sog. „multiwell plates“ und „plate readern“, also Auslesegeräten zur Erfassung der Ergebnisse, arbeiten und damit eine hohe Anzahl von Messergebnissen verschiedener Substanzen auf ihre biologische Aktivität oder Zellviabilität prüfen können. In der vorliegenden Arbeit ist die klassische Verwendung individualisiert auf einzelne, größere Gewebeproben übertragen worden. Um dabei die Funktionalität, Inkubationsdauer und schließlich den Messerfolg zu überprüfen, ist vor Versuchsdurchführung eine Testreihe durchgeführt worden, die zwar grundsätzlich positive Resultate in Bezug auf Anwendung und Messergebnis lieferte (s. 2.2.3, Tab. 4 und Abb. 6). Abschließend ist eine absolute Sicherheit zur Aussagekraft des hier angewandten Untersuchungsverfahrens aufgrund des Pilotcharakters und damit einhergehend fehlender Datenlage nicht möglich.

Neben dem MTS/PMS Assay ist im Rahmen von Vorversuchen eine weitere Methode eruiert worden, um einen möglichen Vitalitätsnachweis erreichen zu können und zudem neben der reinen Zellvitalität eine Funktionalität des Muskels nachzuweisen. Durch gezielte elektrische Stimulation sollte eine Kontraktion der Zungenmuskulatur provoziert werden, die mess- und in geeigneten Abstufungen quantifizierbar sein sollte. Wegen fehlender Genauigkeit und Quantifizierbarkeit ist aber auf diese Nachweismethode während der Versuchsdurchführungen verzichtet worden. Gründe für die fehlende Genauigkeit und Quantifizierbarkeit der Muskelkontraktion könnten in den Abfertigungs- und Vorbehandlungsprozessen während der Verarbeitung der Tierkörper im Schlachthof liegen, die eine solche sensible Untersuchungsmethode im Nachhinein verhindern.

4.2 Ergebnisse

Neben Parametern wie Pulsatilität und Temperatur gibt es noch weitere Faktoren, die möglicherweise einen Einfluss auf Transplantatüberleben und -funktion haben könnten. So bestehen auch Zusammenhänge zwischen Durchflussgeschwindigkeiten und Durchmesser der zuführenden und drainierenden Gefäße, die die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Transplantation beeinflussen. Rubino et al. konnten in einer Untersuchung zeigen, dass diese Faktoren insbesondere in Kombination mit dem Gewicht des Transplantates Einfluss auf mögliche Komplikationen wie einer venösen Stauung haben können, die eine der häufigsten Ursachen für einen postoperativen Transplantatverlust darstellen (Rao, Parikh, Goldstein, & Nahabedian, 2010; Steiner, Horch, Ludolph, & Arkudas, 2020). Hierbei wurde der Zusammenhang zwischen Transplantatgröße und -gewicht sowie der Durchflussgeschwindigkeit der anastomosierten Gefäße bei Perforator-Lappen untersucht. Es zeigte sich, dass die arterielle Durchflussgeschwindigkeit signifikant mit dem Transplantatgewicht korrelierte und die venöse Drainage abhängig vom Gefäßdiameter bis zum Überschreiten eines bestimmten Gewichts als sicher eingestuft werden konnte (Rubino et al., 2009). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass präoperativ dadurch das Risiko einer venösen Stauung abgeschätzt werden kann und gegebenenfalls zusätzliche Drainagemaßnahmen eruiert werden sollten. Ein weiteres Instrument zum Abschätzen einer ausreichenden Blutversorgung eines perforatorgestützten Transplantates ist der sogenannte „Flap Viability Index“ (FVI). Pennington et al. entwickelten diesen Index im Rahmen einer

Studie an DIEP-Transplantaten, einem gängigen Perforatortransplantat, das beispielsweise zur Brustrekonstruktion genutzt wird. Ziel war es dabei, eine mögliche Vorhersage von postoperativ langfristig vitalbleibendem Lappengewebe, das anhand des Lumendurchmessers des versorgenden Perforansgefäßes bzw. der versorgenden Perforansgefäße sowie des Transplantatgewichts berechnet wurde, zu machen. Die Untersuchung zeigte, dass ein FVI von kleiner 10 mit einem hohen Risiko an (Teil-) Nekrosen am Transplantat einhergeht, ein FVI von über 20 dagegen eine hohe Sicherheit bezüglich des gesamten Transplantatüberlebens zeigte. Werte zwischen 10 und 20 ergaben zumindest ein kleines Risiko für (teil-)nekrotische Transplantate (Pennington, Rome, & Kitchener, 2012). Eine weitere Studie untersuchte in diesem Zusammenhang zusätzlich die mittleren Durchflussraten in den Perforansgefäßen der Transplantate in Bezug zu deren Anzahl unter Berücksichtigung des FVI. Die Ergebnisse lassen daraus schlussfolgern, dass einzelne, größere Perforatoren eine höhere Durchflussrate aufweisen und damit eine größere Sicherheit bezüglich des Transplantatüberlebens angenommen werden kann, als dies bei mehreren kleinen Perforatoren der Fall ist (Dusseldorp & Pennington, 2014). Eine genaue Angabe von optimalen Durchflussschwindigkeiten, idealerweise auch in Bezug zur Transplantatgröße bzw. zum Transplantatgewicht und dessen Zusammensetzung, findet sich in der Literatur allerdings nicht.

Auch in dieser Arbeit wurden das Gewicht und die Durchflussschwindigkeiten der perfundierten Präparate erfasst und bezogen auf die gemessenen Vitalitätswerte ausgewertet. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (s. Tab. 12). Mögliche Gründe hierfür könnten neben der fehleranfälligen Methodik in der vorliegenden Arbeit auch eine zu geringe Anzahl an untersuchten Präparaten sowie sehr wahrscheinlich auch ein zu geringer Unterschied im Gewicht bzw. im Flow der einzelnen Präparate zueinander sein. Weitere Untersuchungen mit speziellem Fokus auf diese Fragestellung sollten folgen, um einen Zusammenhang zwischen Gewicht, Durchflussschwindigkeit und Vitalität von perfundierten Muskeltransplantaten zu bestätigen.

Die Ischämiezeit ist ein weiterer entscheidender Einflussfaktor für das Überleben eines Transplantates. Ischämie kann definiert werden als unzureichende Blutversorgung für ein bestimmtes Gewebeareal (Kerrigan & Daniel, 1982; Walter & Israel, 1979), die kritische Ischämiezeit also entsprechend als die maximale Zeitdauer, bis zu der ein Gewebe einer unzureichenden Blutversorgung standhalten kann und vital bleibt (Kerrigan & Daniel, 1982).

Am Schwein durchgeführte Experimente zeigten bereits 1972 in einer Arbeit von Milton et al., dass von der Blutversorgung getrennte gestielte Insellappen eine Ischämiezeit von bis zu fünfzehn Stunden tolerierten (Milton, 1972). Da es sich hierbei allerdings um kutane Lappen handelte und sich die tolerierte Ischämiezeit je nach Gewebezusammensetzung deutlich unterscheidet, muss dies je nach Transplantat berücksichtigt werden. Die in dieser Arbeit als reine Muskellappen zur Anwendung gekommenen Transplantate zeigen eine deutlich geringere Ischämietoleranz. Es ist beschrieben, dass Muskellappen von Ratten bei Raumtemperatur eine Ischämietoleranz von ungefähr sechs Stunden aufweisen (Fowler, Li, X., & Cooley, 1999; Li, X., Cooley, & Gould, 1993). Andere Untersuchungen, ebenfalls an freien Muskellappen von Ratten, belegen dagegen, dass sich der Energiestoffwechsel von Muskelzellen nach einer Ischämiezeit von bis zu drei Stunden schnell erholt, nach vier Stunden aber bereits schwere irreversible Veränderungen auftreten (Wolff, K. D. & Stiller, 1993).

Um bereits vor Versuchsbeginn irreversible Schäden an den Schweinezungen durch zu lange Ischämiezeiten zu verhindern, ist die Zeitdauer zwischen Schlachtung der Tiere und Anschluss der Schweinezungen an die extrakorporale Perfusionseinheit stets unter drei Stunden geblieben. Eine genaue Dokumentation der Ischämiezeit ist aufgrund der Schlachtprozesse mit der anschließenden Verarbeitung nicht möglich gewesen, wäre aber für weitere Untersuchungen interessant, um auch die oben genannten, voneinander abweichenden zeitlichen Angaben genauer eingrenzen zu können.

Bei Betrachtung der Einzelauswertungen lässt sich im Hinblick auf die Vitalitätswerte der verschiedenen Messpunkte im proximalen bzw. distalen Bereich des jeweiligen Präparates ein eindeutiger Trend feststellen. Zu Beginn der Versuchsdurchführung zeigten sich bei durchweg allen Gruppen die im proximalen Segment entnommenen Gewebeproben durchschnittlich als vitaler. Weiterhin kam es im zeitlichen Verlauf kontinuierlich zu einer Abnahme der gemessenen Vitalitätswerte, sowohl bei den im proximalen als auch bei den im distalen Bereich entnommenen Gewebeproben (s. Abb. 13 - 16). Diese erwartbaren Ergebnisse zeigen zwar einerseits, dass es zu keiner nachweisbaren Vitalerhaltung der untersuchten Muskelpräparate mithilfe der verwendeten Perfusionslösungen im untersuchten Zeitraum von acht Stunden kam. Andererseits zeigen sie, dass sich die Methodik des Vitalitätsnachweises an sich, trotz einiger möglichen Ungenauigkeiten, als erfolgreich erwiesen hat. Zudem wird durch die Ergebnisse bestätigt, dass entfernt gelegene Bereiche

eine geringere Vitalität aufweisen als zentrale und somit als sog. „letzte Wiese“ häufiger und früher von Minderdurchblutung und Nekrose betroffen sind (Hossmann & Heiss, 2016). Weiterhin ist den Kurvendiagrammen zu entnehmen, dass die Abnahme der gemessenen Vitalitätswerte in den proximalen Anteilen stärker war als in den distalen. Dies bestätigt o.g. Aussage ebenso wie die Beobachtung, dass innerhalb der ersten vier Stunden die Vitalitätsabnahme stärker ausfiel als in den darauffolgenden vier Stunden.

Neben dem Nachweis der reinen Zellvitalität ist insbesondere bei der Perfusion von Organen ein Nachweis der erhaltenen Funktionalität von Bedeutung, die sich je nach verwendeter Perfusionslösung unterscheiden kann. Durch den hier angewandten experimentellen Studienaufbau ist dazu keine Aussage möglich und muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

4.3 Begleitende Versuche und relevante Vorarbeiten

Bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen mit Anwendung eines maschinellen Perfusionssystems existieren bereits einige Vorarbeiten, die in Anlehnung daran weitere relevante Aspekte untersucht haben.

Grundlegende Untersuchungen und Kenntnisse wurden bereits im Rahmen der Entwicklung eines selbstkonstruierten extrakorporalen Perfusionssystem getätigt und erworben (Fichter, 2015). Hierbei wurden epigastrische Lappen im Kleintiermodell bei Ratten mithilfe eines eigens entwickelten Perfusionssystems (Wolff, K. D., Fichter, Braun, Bauer, & Humbs, 2014) perfundiert, replantiert und anschließend bezüglich Vitalität und Einheilungsrate evaluiert. Durch den äußerst breiten und ausführlichen Studienaufbau wurden zudem wichtige Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge im Gewebetransplantat erlangt und darüber hinaus ein wesentlicher Grundstein für die weitere Forschung an freier Gewebetransplantation mithilfe eines extrakorporalen Perfusionssystems gelegt (Fichter, 2015).

Eine der nachfolgenden Studien untersuchte den Einfluss verschiedener Perfusionslösungen und den des angewandten Perfusionsdrucks auf die Entstehung eines Ödems (Wolff, K. D., von Bomhard, A., Wolff, C., Ritschl, L., Fichter A., 2022 (vsl.)), das in gewissem Ausmaß unweigerlich als Nebeneffekt einer maschinellen Perfusion auftritt. Eine ausgeprägte Ödembildung kann dabei zur mechanischen Kompression sowie zum Diffusionshindernis der

feinen Kapillaren führen. Als Folge daraus kann es im weiteren Verlauf dann zur Minderperfusion mit konsekutivem Absterben des perfundierten Gewebes kommen. In der oben genannten Studie wurden die Perfusionslösungen Gelofusin, Steen und Ringerlösung miteinander verglichen bei Perfusionsdrücken von 40mmHg und 80mmHg. Zur Quantifizierung der Ödembildung wurde das Gewicht der Versuchspräparate zu Beginn und nach Beenden der Versuchsdurchführung erhoben. Es zeigte sich, dass es bei Anwendung spezieller Perfusionslösungen wie Gelofusin und Steen zu einer geringeren Ödembildung kam, die zudem erst nach längerer Latenz im Vergleich zur kristalloiden Ringer Lösung auftrat. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich ein geringerer Perfusionsdruck von 40mmHg positiv auf die Entwicklung eines Ödems ausübte. Die Gewichtszunahme war hier verglichen zu einem Perfusionsdruck von 80mmHg nur etwa halb so groß (Wolff, K. D., von Bomhard, A., Wolff, C., Ritschl, L., Fichter A., 2022 (vsl.)).

In einer weiteren Untersuchung wurde die maschinelle Perfusion mithilfe der extrakorporalen Membranoxygenierung zur Vitalerhaltung eines autologen Gewebetransplantats am Menschen untersucht (Wolff, K. D. et al., 2020). Als Vorversuche wurden hier zunächst Transplantate bei Verstorbenen entnommen und maschinell perfundiert, um die praktische Durchführung sowie technische Details zu untersuchen. Anschließend wurde die Indikation einer freien Gewebetransplantation bei insgesamt fünf Patienten gestellt, bei denen die üblichen Rekonstruktionsmöglichkeiten nicht anwendbar oder nicht erfolgsversprechend gewesen wären. Es zeigte sich, trotz einiger Komplikationen wie Infektion, venöser Stauung und teilweisem Gewebeverlust, dass die Methodik der extrakorporalen Perfusion freier Gewebetransplantate in ausgewählten Fällen zukünftig als Behandlungsoption in Frage kommen könnte (Wolff, K. D. et al., 2020).

4.4 Literaturvergleich

Die Organ- und Gewebepерfusion freier Transplantate mithilfe künstlicher Perfusionslösungen ist in der Literatur eine viel beachtete Thematik. Eine der ersten Versuchsdurchführungen im Hinblick auf freie Lappentransplantate wurde 1991 von Kreidstein et al. veröffentlicht. In einer Untersuchung an periumbilikalen Hauttransplantaten, ähnlich den bereits weiter oben erwähnten DIEP-Transplantaten, wurde innerhalb von drei Stunden nach Beginn der Ischämiezeit das arterielle Gefäß des Transplantates kanüliert und mit Krebs-Henseleit

Pufferlösung künstlich perfundiert. Über den venösen Auslass wurde die mit Albumin und Insulin versetzte Lösung wieder aufgefangen und hinsichtlich verschiedener Parameter biochemisch untersucht. Außerdem ist dem Perfusat Norepinephrin bzw. Acetylcholin beigefügt worden und der Gefäßwiderstand gemessen worden. Die Ergebnisse zeigten, dass das Transplantat über einen Zeitraum von vier Stunden, in der die Perfusion stattfand, metabolisch aktiv geblieben ist. Zudem konnte durch die gemessene Zu- bzw. Abnahme des Gefäßwiderstandes nach Zusatz von Norepinephrin bzw. Acetylcholin der Funktionserhalt von Endothel und glatter Gefäßwandmuskulatur nachgewiesen werden (Kreidstein et al., 1991). Ozturk et al. erweiterten 2019 die Untersuchungen von Kreidstein et al., indem sie im Rahmen von Abdominalplastiken gewonnene DIEP-Transplantate mithilfe extrakorporaler Membranoxygenierung für mehrere Tage perfundierten. Dafür wurden zu- und abführende Perforansgefäße kanüliert und mit aus Erythrozytenkonzentraten gewonnenem Blut dauerhaft normotherm perfundiert. Die Transplantate wurden über einen Zeitraum von durchschnittlich sechs Tagen perfundiert, ohne dass es zu einer kompletten Transplantatnekrose kam. Jedoch zeigte sich durchweg eine teils deutliche und abrupte Abnahme des venösen Rückstroms ab dem vierten Tag mit der Folge eines Abfallens des pH-Wertes in der Blutgasanalyse sowie begleitender Epitheliolyse der Transplantate. Histologisch zeigte sich diese Epitheliolyse in einer dermoepidermalen Separation, die ab dem vierten Tag zunehmend fortschritt (Ozturk et al., 2019).

In einer anderen Arbeit untersuchten Constantinescu et al. im Forschungsgebiet von Trans- und Replantationen von Extremitäten bei Amputationen die Machbarkeit und Erfolgsrate einer extrakorporalen Perfusion im Tiermodell. Dafür wurden Vordergliedmaßen von Schweinen mithilfe von heparinisiertem Eigenblut für die Dauer von zwölf Stunden perfundiert. In einer Vergleichsgruppe wurden die Gliedmaßen über eine entsprechende Zeitdauer bei 4°C gekühlt gelagert. Die Untersuchungsergebnisse zeigten in der Versuchsgruppe während der gesamten Perfusion einen dauerhaft möglichen Funktionserhalt, der mithilfe von Muskelstimulationen nachgewiesen wurde, bei nur geringen histologisch nachweisbaren Schäden auf zellulärer Ebene, wohingegen in der Vergleichsgruppe ein Funktionsverlust bei histologisch nahezu unverändertem Gewebe eingetreten nachweisbar war (Constantinescu et al., 2011). Die Autoren wiesen damals schon die erfolgreiche Durchführung und zumindest temporäre Vitalerhaltung von Extremitäten mittels extrakorporaler Perfusion nach und regten weitere zukünftige Untersuchungen

bezüglich dieser Fragestellung an. Eine ausführlichere Untersuchung an Muskeltransplantaten vom Schwein führten 2019 Krui et al. durch. Hierbei wurden M. rectus abdominis Transplantate entnommen und für 36 Stunden entweder mit Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat oder mit der University of Wisconsin Lösung perfundiert. In einer Kontrollgruppe wurden entsprechende Transplantate bei circa 4°C gekühlt gelagert. Auch hier zeigten die Ergebnisse, dass die Perfusion über eine deutlich längere Zeit von 36 Stunden durchführbar war. Verglichen zur Kontrollgruppe konnte mithilfe einer Indocyaningrün-Angiographie eine ausgeprägte und homogene Perfusion in den Versuchsgruppen dargestellt werden sowie eine geringere Genexpression von Apoptose- und Inflammationsfaktoren nachgewiesen werden. Eine Überlegenheit der extrakorporalen Perfusion verglichen zur Kaltlagerung sehen die Autoren auch in dieser Studie, obwohl diesbezüglich weitergehende Untersuchungen notwendig seien (Kruit et al., 2019).

4.5 Ausblick

Die Anwendung eines Systems zur extrakorporalen Perfusion von Gewebetransplantaten, im besten Fall mit Blutersatzlösungen, ist eine Idee, die bisher nur vereinzelt klinisch zum Einsatz gekommen ist. Bei Betrachtung der in Abschnitt 1.1 genannten „rekonstruktiven Leiter“ könnten Erkenntnisse dieser Arbeit einen Beitrag dazu leisten, diese gedankliche Entscheidungshilfe um eine weitere Sprosse zu ergänzen und Lösungsansätze bieten, um beim sog. „vessel-depleted neck“ mit freien Lappenplastiken ohne lokalen, mikrochirurgischen Gefäßanschluss rekonstruktive Maßnahmen trotzdem erfolgversprechend anzuwenden. Durch die fehlende Notwendigkeit einer mikrochirurgischen Gefäßpräparation sowie der nachfolgenden Gefäßanastomose könnte nicht nur die Operationsdauer deutlich reduziert werden. Weiterhin wäre die Durchführung von rekonstruktiven Maßnahmen mithilfe freier Lappenplastiken auch außerhalb großer Zentren regelhaft möglich, an denen häufig die fehlende mikrochirurgische Expertise und Ausbildung einen limitierenden Faktor darstellen. Auch das Aussetzen von Tierversuchen durch das fehlende Erfordernis einer mikrochirurgischen Ausbildung für die Transplantation freier Lappen wäre ein positiver Aspekt. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass eine breite chirurgische Expertise unter Einbezug der Mikrochirurgie, auch für ein adäquates Gewebehandling oder beispielsweise in der Mikroneurochirurgie für Nervkoaptationen sinnvoll ist und grundsätzlich

als Basis für ein sicheres und komplikationsfreies Operieren dient.

Auch in der Traumatologie und Notfallmedizin sowie der Transplantationsmedizin könnte die Idee der extrakorporalen Perfusion von ganzen Organen oder Extremitäten zukünftig regelhaft Einzug in die klinische Anwendung finden. Erste klinische Versuche und Fallbeschreibungen, wie z.B. von Greaney et al. zeigen, dass eine temporäre Perfusion einer gesamten oberen Extremität mithilfe einer ECMO nach traumatischer Abtrennung über einen Zeitraum von wenigen Tagen mit Erhalt der Vitalität möglich ist (Greaney et al., 2010). Zwar ist in o.g. Fallbeschreibung eine dauerhafte Replantation des Arms aufgrund einer ausgedehnten Infektion letztlich ausgeblieben. Dennoch zeigt dieses Beispiel ebenso wie die bereits in Abschnitt 1.2.3.1 beschriebenen Studien zur Organtransplantation unter Einbezug einer extrakorporalen Perfusionseinheit, dass hinsichtlich dieser Methodik großes Potential zur regelhaften klinischen Anwendung in Zukunft besteht.

Die Perfusion einzelner Körperregionen oder Extremitäten zu therapeutischen Zwecken mithilfe einer extrakorporalen Perfusionseinheit stellt ebenfalls eine vielversprechende Anwendungsmöglichkeit dar. So existieren bereits Untersuchungen zur Behandlung von ischämischen Extremitäten, die mithilfe einer ECMO eine effektivere Therapie als die systemische Lyse und den Verzicht einer sonst oft unumgänglichen Amputation der betroffenen Extremität herbeiführen (Lane et al., 2008; Quinones-Baldrich, Colburn, Gelabert, Barcliff, & Moore, 1994). Ebenso wäre die Nutzung von Medikamenten oder Chemotherapeutika beispielsweise zur Behandlung von Malignomen ohne damit einen systemischen, für den Gesamtorganismus kompromittierenden Effekt zu erzielen, für eine nebenwirkungsärmere und gezieltere Tumortherapie von Bedeutung. Theoretische Möglichkeiten, mit Blick auf die in dieser Arbeit untersuchten Zungenkörper, wie etwa die Durchführung einer nach Explantation des Zungenkörpers (neoadjuvanten) Chemo- oder Radiotherapie, bei gleichzeitigem Vitalerhalten durch Aufrechterhaltung einer extrakorporalen Perfusion mittels geeigneter Blutersatzlösung sowie anschließender Replantation, könnten unter Ausbleiben von systemischen und lokoregionären Nebenwirkungen neuartige Behandlungsoptionen bei Zungenkarzinomen werden. Letztlich müssen aber auch ökonomische Überlegungen für die noch sehr hohen Anschaffungskosten einer extrakorporalen Perfusionseinheit sowie den dazugehörigen geeigneten Perfusionslösungen bedacht werden und sämtliche damit in Verbindung gebrachte, neu entwickelte Therapieoptionen mit den aktuell in den jeweiligen Fachdisziplinen als

Goldstandard vorherrschenden Behandlungskonzepten abgewogen werden. Diesbezüglich besteht auch weiterhin ein noch anhaltend großer Forschungsbedarf.

5 Zusammenfassung

Die rekonstruktive Chirurgie mithilfe freier Gewebetransplantate hat durch ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und hohen Erfolgsraten mittlerweile eine weite Verbreitung in der klinischen Anwendung vielzähliger chirurgischer Disziplinen gefunden. Durch ihre aufwendige chirurgische Vorgehensweise zur Lappenhebung und Gefäßanastomosierung unter Anwendung mikrochirurgischer Techniken ist sie jedoch spezialisierten Zentren mit diesbezüglich gut ausgebildeten Operateuren und entsprechender Krankenhausinfrastruktur vorbehalten. Zudem stößt sie immer wieder an ihre Grenzen, beispielsweise nach mehrfachen Voroperationen, Bestrahlungen oder ausgeprägter Arteriosklerose und ist damit als letzte Option für eine plastische und/oder funktionelle Rekonstruktion nicht durchführbar.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde als möglicher Lösungsansatz für diese Problematik eine modifizierte extrakorporale Perfusionseinheit an porcine Muskeltransplantate angeschlossen und diese für einen Zeitraum von acht Stunden perfundiert. Es wurden drei Gruppen mit jeweils verschiedenen Perfusionslösungen sowie eine Gruppe ohne Perfusion gebildet und in regelmäßigen Zeitabständen Gewebeproben zum laborchemischen Vitalitätsnachweis entnommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die chirurgisch-maschinelle Verknüpfung der extrakorporalen Perfusionseinheit mit den Transplantaten als auch der laborchemische Vitalitätsnachweis der entnommenen Gewebeproben gelungen ist. Die weitere Aufarbeitung der gewonnenen Daten zeigt allerdings keine statistische Signifikanz für die Überlegenheit einer der Perfusionslösungen. Probleme und Fehlerquellen dieses neuartigen Versuchsaufbaus werden ausführlich diskutiert.

Schlussfolgernd zeigt diese experimentelle Studie mögliche Lösungsansätze zur Behandlung chirurgisch anderweitig schwer beherrschbarer Situationen auf und liefert darüber hinaus wertvolle Erkenntnisse zur Anwendung einer normothermen extrakorporalen Perfusion von freien Gewebetransplantaten. Sie hebt zudem die Relevanz zur Weiterentwicklung chirurgischer Techniken hervor und verknüpft diese mit dem zukünftig wachsenden Potential einer extrakorporalen Perfusion mithilfe von Blutersatzlösungen. Weiterer Forschungsbedarf zur breiten klinischen Anwendung dieser Methodik ist unbedingt notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Allen, EE. (1888). The Allen surgical pump. *Lancet*(2), 228-229.
- Altman, F. P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9(3), 1-56.
doi:10.1016/s0079-6336(76)80015-0
- Ang, E., Black, C., Irish, J., Brown, D. H., Gullane, P., O'Sullivan, B., & Neligan, P. C. (2003).
Reconstructive options in the treatment of osteoradionecrosis of the
craniomaxillofacial skeleton. *Br J Plast Surg*, 56(2), 92-99. doi:10.1016/s0007-
1226(03)00085-7
- Arai, K., Hotokebuchi, T., Miyahara, H., Mohtai, M., Kitadai, H. K., Sugioka, Y., & Kaibara, N.
(1993). Successful long-term storage of rat limbs. The use of simple immersion in
Euro-Collins solution. *Int Orthop*, 17(6), 389-396. doi:10.1007/bf00180460
- Arias-Diaz, J., Alvarez, J., Gomez, M., del Barrio, R., Garcia-Carreras, C., Gonzalez, P., &
Balibrea, J. L. (1997). Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during
normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II non-heart-
beating donor. *Transplant Proc*, 29(8), 3486-3487.
- Barrou, B., Billault, C., & Nicolas-Robin, A. (2013). The use of extracorporeal membranous
oxygenation in donors after cardiac death. *Curr Opin Organ Transplant*, 18(2), 148-
153. doi:10.1097/MOT.0b013e32835e29f5
- Bartlett, R. (2017, June 16). www.UpToDate.com, Extracorporeal membrane oxygenation
(ECMO) in adults. Retrieved from
[https://www.uptodate.com/contents/extracorporeal-membrane-oxygenation-ecmo-
in-adults?source=search_result&search=ecmo%20definition&selectedTitle=2~150](https://www.uptodate.com/contents/extracorporeal-membrane-oxygenation-ecmo-in-adults?source=search_result&search=ecmo%20definition&selectedTitle=2~150)
- Belzer, F. O., & Southard, J. H. (1988). Principles of solid-organ preservation by cold storage.
Transplantation, 45(4), 673-676.
- Boekema, B. K., Boekestijn, B., & Breederveld, R. S. (2015). Evaluation of saline, RPMI and
DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns*, 41(4), 848-852.
doi:10.1016/j.burns.2014.10.016
- Bozиков, K., & Arnez, Z. M. (2006). Factors predicting free flap complications in head and
neck reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 59(7), 737-742.
doi:10.1016/j.bjps.2005.11.013

- Bretschneider, H. J. (1980). Myocardial protection. *Thorac Cardiovasc Surg*, 28(5), 295-302.
doi:10.1055/s-2007-1022099
- Bundesärztekammer. (2008). Mitteilungen: Arznei-mittel-kommission der deutschen Ärzteschaft: „Aus der UAW-Datenbank“ - Schwerwiegende Kreislaufreaktionen nach intravenöser Gabe von Toluidinblau® zur Darstellung der ableitenden Harnwege. *Dtsch Arztebl*, 105(28-29), 1570.
- Chen, X. S., Fang, T. L., Cai, R. B., & Guo, G. L. (2002). [Development of MTS/pms colorimetric assay in the proliferation of leukemic cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 10(5), 438-440.
- Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M., & Terasaki, P. I. (1969). Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet*, 2(7632), 1219-1222. doi:10.1016/s0140-6736(69)90753-3
- Collins, G. M., Jones, A. C., & Halasz, N. A. (1977). Influence of preservation method on early transplant failure. *Transplant Proc*, 9(3), 1523-1528.
- Constantinescu, M. A., Knall, E., Xu, X., Kiermeir, D. M., Jenni, H., Gygax, E., Rieben, R., Banic, A, Vogelin, E. (2011). Preservation of amputated extremities by extracorporeal blood perfusion; a feasibility study in a porcine model. *J Surg Res*, 171(1), 291-299.
doi:10.1016/j.jss.2010.01.040
- Cooley, D. A. (1987). Development of the roller pump for use in the cardiopulmonary bypass circuit. *Tex Heart Inst J*, 14(2), 112-118.
- Cypel, M., Yeung, J. C., Hirayama, S., Rubacha, M., Fischer, S., Anraku, M., Sato, M., Harwood, S., Pierre, A., Waddell, T. K., de Perrot, M., Liu, M., Keshavjee, S. (2008). Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*, 27(12), 1319-1325. doi:10.1016/j.healun.2008.09.003
- Cypel, M., Yeung, J. C., Liu, M., Anraku, M., Chen, F., Karolak, W., Sato, M., Laratta, J., Azad, S., Madonik, M., Chow, C. W., Chaparro, C., Hutcheon, M., Singer, L. G., Slutsky, A., S., Yasufuku, K., de Perrot, M., Pierre, A. F., Waddell, T. K., Keshavjee, S. (2011). Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*, 364(15), 1431-1440. doi:10.1056/NEJMoa1014597
- DeBakey, ME. (1934). A simple continuous flow blood transfusion instrument. *New Orleans Med Surg J*, 87, 386-389.

- Dusseldorp, J. R., & Pennington, D. G. (2014). Quantifying Blood Flow in the DIEP Flap: An Ultrasonographic Study. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2(10), e228. doi:10.1097/GOX.0000000000000191
- Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130(3373), 432-437. doi:10.1126/science.130.3373.432
- Ethunandan, M., Cole, R., & Flood, T. R. (2007). Corlett loop for microvascular reconstruction in a neck depleted of vessels. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 45(6), 493-495. doi:10.1016/j.bjoms.2006.08.014
- Feindt, P, Harig, F, Weyand, M. (2006). *Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine*, ISBN: 3-7985-1504-2, p. 317: Steinkopff Verlag Darmstadt.
- Fichter, A. M. (2015). *Entwicklung eines extrakorporalen Perfusionssystems zur Vitalerhaltung freier Gewebetransplantate im Kleintiermodell. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Zahnheilkunde". Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Technische Universität München.*
- Fondevila, C., Hessheimer, A. J., Flores, E., Ruiz, A., Mestres, N., Calatayud, D., Paredes, D., Rodriguez, C., Fuster, J., Navasa, M., Rimola, A., Taura, P., Garcia-Valdecasas, J. C. (2012). Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation. *Am J Transplant*, 12(1), 162-170. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03834.x
- Fowler, J. D., Li, X., & Cooley, B. C. (1999). Brief ex vivo perfusion with heparinized and/or citrated whole blood enhances tolerance of free muscle flaps to prolonged ischemia. *Microsurgery*, 19(3), 135-140. doi:10.1002/(sici)1098-2752(1999)19:3<135::aid-micr3>3.0.co;2-y
- Frey, M von, Gruber, M. (1885). Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe. Ein Respirations-Apparat für isolierte Organe. *Virchow's Arch Physiol*(9), 519–532.
- Fridell, J. A., Mangus, R. S., & Tector, A. J. (2009). Clinical experience with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in abdominal organ preservation: a review of recent literature. *Clin Transplant*, 23(3), 305-312. doi:10.1111/j.1399-0012.2008.00952.x
- Garcia Saez, D., Zych, B., Sabashnikov, A., Bowles, C. T., De Robertis, F., Mohite, P. N., Popov, A.F., Maunz, O., Patil, N. P., Weymann, A., Pitt, T., McBrearty, L., Pates, B., Hards, R., Amrani, M., Bahrami, T., Banner, N. R., Simon, A. R. (2014). Evaluation of the organ

- care system in heart transplantation with an adverse donor/recipient profile. *Ann Thorac Surg*, 98(6), 2099-2105; discussion 2105-2096.
doi:10.1016/j.athoracsur.2014.06.098
- Gertz, D., Rennels, M. L., & Nelson, E. (1975). Endothelial cell ischemic injury: protective effect of heparin or aspirin assessed by scanning electron microscopy. *Stroke*, 6(4), 357-360. doi:10.1161/01.str.6.4.357
- Gohrbandt, B., Simon, A. R., Warnecke, G., Fischer, S., Hagl, C., Niehaus, A., Gottlieb, J., Welte, T., Haverich, A., Strueber, M. (2015). Lung Preservation With Perfadex or Celsior in Clinical Transplantation: A Retrospective Single-Center Analysis of Outcomes. *Transplantation*, 99(9), 1933-1939. doi:10.1097/TP.0000000000000578
- Gonzalez, F. X., Garcia-Valdecasas, J. C., Lopez-Boado, M. A., Tabet, J., Net, M., Grande, L., Cifuentes, A., Rull, R., Valero, R., Beltran, J., Elena, M., Cabrer, C., Palacin, J., Visa, J. (1997). Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc*, 29(8), 3480-3481.
- Gottlieb, L. J., & Krieger, L. M. (1994). From the reconstructive ladder to the reconstructive elevator. *Plast Reconstr Surg*, 93(7), 1503-1504. doi:10.1097/00006534-199406000-00027
- Greaney, P. J., Jr., Cordisco, M., Rodriguez, D., Newberger, J., Legatt, A. D., & Garfein, E. S. (2010). Use of an extracorporeal membrane oxygenation circuit as a bridge to salvage a major upper-extremity replant in a critically ill patient. *J Reconstr Microsurg*, 26(8), 517-522. doi:10.1055/s-0030-1262951
- Grzella, Sascha. (2016). Ergebnisse nach statischer, hypothermer Organkonservierung mit HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) und UW-Lösung (University of Wisconsin) bei 240 Pankreastransplantationen. 17.
- Hanasono, M. M., Barnea, Y., & Skoracki, R. J. (2009). Microvascular surgery in the previously operated and irradiated neck. *Microsurgery*, 29(1), 1-7. doi:10.1002/micr.20560
- Haubner, F., Ohmann, E., Pohl, F., Strutz, J., & Gassner, H. G. (2012). Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiat Oncol*, 7, 162. doi:10.1186/1748-717X-7-162
- Hossmann, K. A., & Heiss, W. D. (2016). History of the Letzte Wiese/Last Meadow Concept of Brain Ischemia. *Stroke*, 47(3), e46-50. doi:10.1161/STROKEAHA.115.010976

- Hurst, L. N., Lindsay, W. K., & Lee, J. (1973). Viability of skin grafts stored in various media. *Can J Surg*, 16(3), 206-209.
- Ingemansson, R., Massa, G., Pandita, R. K., Sjoberg, T., & Steen, S. (1995). Perfadex is superior to Euro-Collins solution regarding 24-hour preservation of vascular function. *Ann Thorac Surg*, 60(5), 1210-1214. doi:10.1016/0003-4975(95)00548-Y
- Janis, J. E., Kwon, R. K., & Attinger, C. E. (2011). The new reconstructive ladder: modifications to the traditional model. *Plast Reconstr Surg*, 127 Suppl 1, 205S-212S. doi:10.1097/PRS.0b013e318201271c
- Kasper, C. (2006). Neue Ansätze in der Zellkulturtechnik. Habilitationsschrift der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover.
- Kennedy, J. D., Thayer, W., Beuno, R., Kohorst, K., & Kumar, A. B. (2017). ECMO in major burn patients: feasibility and considerations when multiple modes of mechanical ventilation fail. *Burns Trauma*, 5, 20. doi:10.1186/s41038-017-0085-9
- Kerrigan, C. L., & Daniel, R. K. (1982). Critical ischemia time and the failing skin flap. *Plast Reconstr Surg*, 69(6), 986-989. doi:10.1097/00006534-198206000-00014
- Keshavjee, S. H., Yamazaki, F., Yokomise, H., Cardoso, P. F., Mullen, J. B., Slutsky, A. S., & Patterson, G. A. (1992). The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 103(2), 314-325.
- Kiyozumi, T., Kanatani, Y., Ishihara, M., Saitoh, D., Shimizu, J., Yura, H., Suzuki, S., Okada, Y., Kikuchi, M. (2006). Medium (DMEM/F12)-containing chitosan hydrogel as adhesive and dressing in autologous skin grafts and accelerator in the healing process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 79(1), 129-136. doi:10.1002/jbm.b.30522
- Koyama, I., Hoshino, T., Nagashima, N., Adachi, H., Ueda, K., & Omoto, R. (1989). A new approach to kidney procurement from non-heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc*, 21(1 Pt 2), 1203-1205.
- Kreidstein, M. L., Pang, C. Y., Levine, R. H., & Knowlton, R. J. (1991). The isolated perfused human skin flap: design, perfusion technique, metabolism, and vascular reactivity. *Plast Reconstr Surg*, 87(4), 741-749. doi:10.1097/00006534-199104000-00020
- Kruit, A. S., Schreinemachers, M. J. M., Koers, E. J., Zegers, H. J. H., Hummelink, S., & Ulrich, D. J. O. (2019). Successful Long-term Extracorporeal Perfusion of Free

- Musculocutaneous Flaps in a Porcine Model. *J Surg Res*, 235, 113-123.
doi:10.1016/j.jss.2018.09.076
- Lane, R. J., Phillips, M., McMillan, D., Huckson, M., Liang, S. W., & Cuzzilla, M. (2008). Hypertensive extracorporeal limb perfusion (HELP): a new technique for managing critical lower limb ischemia. *J Vasc Surg*, 48(5), 1156-1165; discussion 1165.
doi:10.1016/j.jvs.2008.05.085
- Lassner, F., Becker, M., Fansa, H., Walter, G. F., & Berger, A. (1995). Preservation of peripheral nerve grafts: a comparison of normal saline, HTK organ preservation solution, and DMEM Schwann cell culture medium. *J Reconstr Microsurg*, 11(6), 447-453. doi:10.1055/s-2007-1006559
- Li, H., Sun, S. R., Yap, J. Q., Chen, J. H., & Qian, Q. (2016). 0.9% saline is neither normal nor physiological. *J Zhejiang Univ Sci B*, 17(3), 181-187. doi:10.1631/jzus.B1500201
- Li, X., Cooley, B. C., & Gould, J. S. (1993). Effect of age upon ischemia/reperfusion injury in rat muscle free flaps. *J Surg Res*, 55(2), 193-200. doi:10.1006/jsre.1993.1129
- Madershahian, N., Wittwer, T., Strauch, J., Franke, U. F., Wippermann, J., Kaluza, M., & Wahlers, T. (2007). Application of ECMO in multitrauma patients with ARDS as rescue therapy. *J Card Surg*, 22(3), 180-184. doi:10.1111/j.1540-8191.2007.00381.x
- Maksoud-Filho, J. G., Diniz, E. M., Ceccon, M. E., Galvani, A. L., Chamelian, M. D., Pinho, M. L., & Vaz, F. A. (2001). [Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) in a neonate with respiratory distress due to meconium aspiration syndrome: Effect of the administration of exogenous surfactant]. *J Pediatr (Rio J)*, 77(3), 243-248.
- Marchioro, T. L., Huntley, R. T., Waddell, W. R., & Starzl, T. E. (1963). Extracorporeal Perfusion for Obtaining Postmortem Homografts. *Surgery*, 54, 900-911.
- Maricevich, M., Lin, L. O., Liu, J., Chang, E. I., & Hanasono, M. M. (2018). Interposition Vein Grafting in Head and Neck Free Flap Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 142(4), 1025-1034. doi:10.1097/PRS.0000000000004770
- McCluskey, C., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2005). An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microb Ecol*, 49(3), 379-387. doi:10.1007/s00248-004-0012-z
- Mildh, L., Lemstrom, K. B., Jokinen, J. J., Raivio, P., Suojaranta-Ylinen, R., & Hammainen, P. (2011). [Application of extracorporeal membrane oxygenation therapy (ECMO) in the

- treatment of severe adult respiratory distress syndrome]. *Duodecim*, 127(19), 2055-2062.
- Milton, S. H. (1972). Experimental studies on island flaps. II. Ischemia and delay. *Plast Reconstr Surg*, 49(4), 444-447. doi:10.1097/00006534-197204000-00015
- Moen, O., Hogasen, K., Fosse, E., Dregelid, E., Brockmeier, V., Venge, P., Harboe, M., Mollnes, T. E. (1997). Attenuation of changes in leukocyte surface markers and complement activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 63(1), 105-111. doi:10.1016/s0003-4975(96)00743-6
- Moers, C., Smits, J. M., Maathuis, M. H., Treckmann, J., van Gelder, F., Napieralski, B. P., van Kasterop-Kutz, M., van der Heide, J. J., Squifflet, J. P., van Heurn, E., Kirste, G. R., Rahmel, A., Leuvenink, H. G., Paul, A., Pirenne, J., Ploeg, R. J. (2009). Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*, 360(1), 7-19. doi:10.1056/NEJMoa0802289
- Musial, R., Darocha, T., Kosinski, S., Stolinski, J., Sadowski, J., & Drwila, R. (2015). Application of V-A ECMO therapies for short-term mechanical circulatory support in patients with cardiogenic shock. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 47(4), 324-327. doi:10.5603/AIT.2015.0046
- Nasralla, D., Coussios, C. C., Mergental, H., Akhtar, M. Z., Butler, A. J., Ceresa, C. D. L., Chiochia, V., Dutton, S. J., Garcia-Valdecasas, J. C., Heaton, N., Imber, C., Jassem, W., Jochmans, I., Karani, J., Knight, S. R., Kocabayoglu, P., Malago, M., Mirza, D., Morris, P. J., Pallan, A., Paul, A., Pavel, M., Perera, M., Perera, M., Pirenne, J., Ravikumar, R., Russell, L., Upponi, S., Watson, C. J. E., Weissenbacher, A., Ploeg, R. J., Friend, P. J., Consortium for Organ Preservation in, Europe. (2018). A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature*, 557(7703), 50-56. doi:10.1038/s41586-018-0047-9
- Nicholson, M. L., & Hosgood, S. A. (2013). Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *Am J Transplant*, 13(5), 1246-1252. doi:10.1111/ajt.12179
- Nosanov, L. B., McLawhorn, M. M., Vigiola Cruz, M., Chen, J. H., & Shupp, J. W. (2017). A National Perspective on ECMO Utilization in Patients with Burn Injury. *J Burn Care Res*. doi:10.1097/BCR.0000000000000555

- Oto, T., Griffiths, A. P., Rosenfeldt, F., Levvey, B. J., Williams, T. J., & Snell, G. I. (2006). Early outcomes comparing Perfadex, Euro-Collins, and Papworth solutions in lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, *82*(5), 1842-1848.
doi:10.1016/j.athoracsur.2006.05.088
- Oz, E. S., Aydemir, E., & Fiskin, K. (2012). DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. *Oncol Lett*, *3*(4), 927-929.
doi:10.3892/ol.2012.559
- Ozturk, M. B., Aksan, T., Ozcelik, I. B., Ertekin, C., Akcakoyunlu, B., Ozkanli, S. S., & Tezcan, M. (2019). Extracorporeal Free Flap Perfusion Using Extracorporeal Membrane Oxygenation Device: An Experimental Model. *Ann Plast Surg*, *83*(6), 702-708.
doi:10.1097/SAP.0000000000002014
- Pagano, F., Nocella, C., Sciarretta, S., Fianchini, L., Siciliano, C., Mangino, G., Ibrahim, M., De Falco, E., Carnevale, R., Chimenti, I., Frati, G. (2017). Cytoprotective and Antioxidant Effects of Steen Solution on Human Lung Spheroids and Human Endothelial Cells. *Am J Transplant*, *17*(7), 1885-1894. doi:10.1111/ajt.14278
- Patton, M. L., Simone, M. R., Kraut, J. D., Anderson, H. L., 3rd, & Haith, L. R., Jr. (1998). Successful utilization of ECMO to treat an adult burn patient with ARDS. *Burns*, *24*(6), 566-568.
- Pennington, D. G., Rome, P., & Kitchener, P. (2012). Predicting results of DIEP flap reconstruction: the flap viability index. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *65*(11), 1490-1495. doi:10.1016/j.bjps.2012.05.015
- Promega. (2012). CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. *Technical Bulletin*.
- Qi, W., Ding, D., & Salvi, R. J. (2008). Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hear Res*, *236*(1-2), 52-60.
doi:10.1016/j.heares.2007.12.002
- Quante, M., & Tullius, SG. (2015). Konservierungsmethoden von Organen für die Transplantation: Organqualität lässt sich verbessern. *Dtsch Arztebl*, *112*(6), A-235 / B-203 / C-199.
- Quinones-Baldrich, W. J., Colburn, M. D., Gelabert, H. A., Barcliff, L. T., & Moore, W. S. (1994). Isolated limb thrombolysis with extracorporeal pump and urokinase. *J Surg Res*, *57*(3), 344-351. doi:10.1006/jsre.1994.1153

- Rabanal, J. M., Ibanez, A. M., Mons, R., Gonzalez, A. M., Carbajo, M., Ortega, J., & Zurbano, F. (2003). Influence of preservation solution on early lung function (Euro-Collins vs Perfadex). *Transplant Proc*, 35(5), 1938-1939. doi:10.1016/s0041-1345(03)00690-0
- Rao, S. S., Parikh, P. M., Goldstein, J. A., & Nahabedian, M. Y. (2010). Unilateral failures in bilateral microvascular breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 126(1), 17-25. doi:10.1097/PRS.0b013e3181da8812
- Reddi, B. A. (2013). Why is saline so acidic (and does it really matter?). *Int J Med Sci*, 10(6), 747-750. doi:10.7150/ijms.5868
- Ried, W. (1952). Formazane und Tetrazoliumsals, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angewandte Chemie*, 64(14), 391-396.
- Rubino, C., Ramakrishnan, V., Figus, A., Bulla, A., Coscia, V., & Cavazzuti, M. A. (2009). Flap size/flow rate relationship in perforator flaps and its importance in DIEAP flap drainage. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62(12), 1666-1670. doi:10.1016/j.bjps.2008.05.045
- Sacks, S. A., Petritsch, P. H., & Kaufman, J. J. (1973). Canine kidney preservation using a new perfusate. *Lancet*, 1(7811), 1024-1028. doi:10.1016/s0140-6736(73)90665-x
- Schmid, C., Philipp, A. (2011). *Leitfaden extrakorporale Zirkulation, p. 2*: Springer Verlag, ISBN: 978-3-642-17003-4.
- Schneeberger, S., Biebl, M., Steurer, W., Hesse, U. J., Troisi, R., Langrehr, J. M., Scharek, W., Mark, W., Margreiter, R., Konigsrainer, A. (2009). A prospective randomized multicenter trial comparing histidine-tryptophane-ketoglutarate versus University of Wisconsin perfusion solution in clinical pancreas transplantation. *Transpl Int*, 22(2), 217-224. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00773.x
- Schold, J. D., Kaplan, B., Howard, R. J., Reed, A. I., Foley, D. P., & Meier-Kriesche, H. U. (2005). Are we frozen in time? Analysis of the utilization and efficacy of pulsatile perfusion in renal transplantation. *Am J Transplant*, 5(7), 1681-1688. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00910.x
- Selzner, M., Goldaracena, N., Echeverri, J., Kathis, J. M., Linares, I., Selzner, N., Serrick, C., Marquez, M., Sapisochin, G., Renner, E. L., Bhat, M., McGilvray, I. D., Lilly, L., Greig, P. D., Tsien, C., Cattral, M. S., Ghanekar, A., Grant, D. R. (2016). Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver Transpl*, 22(11), 1501-1508. doi:10.1002/lt.24499

- Staudinger, T. (2018). Extrakorporale Lungenersatzverfahren – was gibt es Neues, was kommt? *Med Klin Intensivmed Notfmed*, *113*, 401-408.
- Steen, S., Liao, Q., Wierup, P. N., Bolys, R., Pierre, L., & Sjoberg, T. (2003). Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg*, *76*(1), 244-252; discussion 252. doi:10.1016/s0003-4975(03)00191-7
- Steen, S., Sjoberg, T., Pierre, L., Liao, Q., Eriksson, L., & Algotsson, L. (2001). Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet*, *357*(9259), 825-829. doi:10.1016/S0140-6736(00)04195-7
- Steiner, D., Horch, R. E., Ludolph, I., & Arkudas, A. (2020). Successful free flap salvage upon venous congestion in bilateral breast reconstruction using a venous cross-over bypass: A case report. *Microsurgery*, *40*(1), 74-78. doi:10.1002/micr.30423
- Tabet, J., Garcia-Valdecasas, J. C., Net, M., Cifuentes, A., Gonzalez, F. X., Valero, R., Deulofeu, R., Rimola, A., Garcia, F., Visa, J. (1997). Evaluation of ischemic liver injury during graft procurement from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc*, *29*(8), 3482-3483.
- Tall, J., Bjorklund, T. C., Skogh, A. C., Arnander, C., & Halle, M. (2015). Vascular Complications After Radiotherapy in Head and Neck Free Flap Reconstruction: Clinical Outcome Related to Vascular Biology. *Ann Plast Surg*, *75*(3), 309-315. doi:10.1097/SAP.0000000000000081
- Timsit, M. O., Adams, W. J., Laguna-Fernandez, A., Ichimura, T., Bonventre, J. V., Garcia-Cardena, G., & Tullius, S. G. (2013). Flow is critical for maintaining a protective phenotype in renal proximal tubular cells. *Am J Transplant*, *13*(6), 1617-1618. doi:10.1111/ajt.12242
- Tosun, Z., Aktan, T. M., Hosnuter, M., Savaci, N., & Duman, S. (2001). Investigation of skin graft viability with DMEM and Ham's F-12 fluids. *Ann Plast Surg*, *47*(2), 217-218. doi:10.1097/00000637-200108000-00026
- Truax, C. (1899). *The mechanics of surgery*. Truax, Chiacgo.
- Valero, R., Garcia-Valdecasas, J. C., Tabet, J., Taura, P., Rull, R., Beltran, J., Garcia, F., Gonzalez, F. X., Lopez-Boado, M. A., Cabrer, C., Visa, J. (1998). Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation*, *66*(2), 170-176.
- von Pechmann, H. (1892). Ueber die Einwirkung von Diazobenzol auf Malonsäure. *Ber. dtsh. chem. Ges.* *25*, 3175-3190.

- von Pechmann, H., & Runge, P. (1894). Oxydation der Formazylverbindungen. II. Mittheilung. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 27, 2920-2930
- Wahlberg, J. A., Love, R., Landegaard, L., Southard, J. H., & Belzer, F. O. (1987). 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation*, 43(1), 5-8.
- Walter, JB, & Israel, MS. (1979). *General Pathology, 5th Edition New York: Churchill Livingstone Chapter 6 and 42.*
- Wang, L., Xu, X. P., Zhan, H., & Zhang, S. M. (2014). Application of ECMO to the treatment of benign double tracheoesophageal fistula: report of a case. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 20 Suppl, 423-426. doi:10.5761/atcs.cr.13-00313
- Wight, J., Chilcott, J., Holmes, M., & Brewer, N. (2003). The clinical and cost-effectiveness of pulsatile machine perfusion versus cold storage of kidneys for transplantation retrieved from heart-beating and non-heart-beating donors. *Health Technol Assess*, 7(25), 1-94. doi:10.3310/hta7250
- Wight, J. P., Chilcott, J. B., Holmes, M. W., & Brewer, N. (2003). Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. *Clin Transplant*, 17(4), 293-307. doi:10.1034/j.1399-0012.2003.00077.x
- Wolff, C. (2017). *Arterielle Intimadefekte und ihre Bedeutung beim mikrovaskulären Gewebettransfer - eine tierexperimentelle Studie an der Rattenaorta. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Titels "Doktor der Medizin". Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Technische Universität München.*
- Wolff, K. D., Fichter, A., Braun, C., Bauer, F., & Humbs, M. (2014). Flap raising on pulsatile perfused cadaveric tissue: a novel method for surgical teaching and exercise. *J Craniomaxillofac Surg*, 42(7), 1423-1427. doi:10.1016/j.jcms.2014.04.004
- Wolff, K. D., Mucke, T., Lehmbruck, J., Loeffelbein, D. J., Kesting, M. R., & Holzle, F. (2009). Rapid autonomisation of a combined fibular- and anterolateral thigh flap transferred by a wrist carrier to an irradiated and vessel depleted neck. *J Surg Oncol*, 99(2), 123-126. doi:10.1002/jso.21205
- Wolff, K. D., Ritschl, L. M., von Bomhard, A., Braun, C., Wolff, C., & Fichter, A. M. (2020). In vivo perfusion of free skin flaps using extracorporeal membrane oxygenation. *J Craniomaxillofac Surg*, 48(1), 90-97. doi:10.1016/j.jcms.2019.12.005

- Wolff, K. D., & Stiller, D. (1993). Ischemia tolerance of free-muscle flaps: an NMR-spectroscopic study in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 91(3), 485-491.
doi:10.1097/00006534-199303000-00015
- Wolff, K. D., von Bomhard, A., Wolff, C., Ritschl, L., Fichter A. (2022 (vsl.)). Pressure and perfusate dependent edema formation in artificially long term perfused skeletal muscle: experimental study on the chicken hindlimb (vsl.). *Unveröffentlichtes Manuskript*.
- Zimmer, H. G. (2003). The heart-lung machine was invented twice--the first time by Max von Frey. *Clin Cardiol*, 26(9), 443-445.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rekonstruktive Leiter, modifiziert (Wolff, C. 2017)	1
Abbildung 2: Von links nach rechts: Verwendete Belzer UW® Perfusionslösung der Firma Bridge to Life, DMEM Nährlösung der Firma Sigma-Aldrich und isotonische Kochsalzlösung der Firma Fresenius Kabi GmbH.....	9
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der kanülierten <i>A. lingualis</i> mit zahlreichen Abgängen. Die darüberliegende Muskulatur ist mit Haltenähten seitlich fixiert (*). Ansicht von unten.....	13
Abbildung 4: Mit Toluidinblau perfundiertes Präparat, das eine nahezu vollständige Anreicherung des Farbstoffs zeigt. Konnektionsstelle mit einliegender Kanüle (*). Ansicht von oben.....	13
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung von mit Gewebeproben und MTS/PMS Assay befüllten Küvetten vor Inkubation.....	14
Abbildung 6: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer der Inkubation von vitalen und avitalen Gewebeproben im Rahmen eines Vorversuchs zur Erfolgskontrolle und Bestimmung einer geeigneten Inkubationsdauer.....	15
Abbildung 7: Verwendetes Perfusionssystem der Firma novalung® (modifiziert, s. Legende).....	17
Abbildung 8: Redox-Reaktion mit der Umwandlung von MTS in Formazan (Promega, 2012).....	18
Abbildung 9: Lambert-Beer'sches Gesetz: $I =$ Intensität des transmittierten Lichts, $I_0 =$ Intensität des einfallenden Lichts, $\epsilon\lambda =$ Extinktionskoeffizient, $c =$ Konzentration, $d =$ Länge des Lichtwegs.....	19
Abbildung 10: Verwendetes BioPhotometer® der Firma Eppendorf.....	19
Abbildung 11: Gewicht der Präparate veranschaulicht im Box-Plot Diagramm.....	22
Abbildung 12: Durchflussgeschwindigkeiten der angewandten Perfusionslösungen veranschaulicht im Box-Plot Diagramm.....	23
Abbildung 13: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit UW Lösung.....	25
Abbildung 14: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit DMEM Nährlösung.....	26
Abbildung 15: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Perfusion mit NaCl.....	28
Abbildung 16: Ermittelte Extinktion in Abhängigkeit zur Dauer im proximalen und distalen Bereich des Präparates während der Lagerung bei Raumtemperatur.....	29
Abbildung 17: Übersichtsabbildung zur ermittelten Extinktion der jeweiligen Versuchsgruppen	

veranschaulicht in Box-Plot Diagrammen. Vergleichend sind die Vitalitätswerte in proximalen Bereichen zu den untersuchten Zeitpunkten T0, T1 und T2 den jeweils korrespondierenden Zeitpunkten in distalen Bereichen gegenübergestellt.....30

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten UW Perfusionslösung bei einem pH von 7,4, einer Osmolalität von 320mosmol/kg und einer Temperatur von 2-8°C (Angabe der Firma Bridge to Life, London, Großbritannien).....	6
Tabelle 2: Zusammensetzung der DMEM Nährlösung (modifiziert, Kasper, 2006)	8
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Kochsalzlösung. Die Angaben beziehen sich dabei auf 1000ml Lösung. (Angabe der Firma Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland).....	9
Tabelle 4: Testlauf zur Bestimmung der geeigneten Inkubationsdauer der Gewebeproben. Aufgelistet sind die Extinktionsmessungen in Arbeitseinheiten von je einer vitalen bzw. avitalen Probe zu jeweiligen Messungszeitpunkten nach verschieden langer Inkubationsdauer. +++ entspricht einem oberhalb des Extinktionsmaximums gemessenen Wert.....	15
Tabelle 5: Gewicht in g der einzelnen Schweinezungen unterteilt zur jeweiligen Versuchsgruppe vor Beginn der Versuchsdurchführungen.....	21
Tabelle 6: Durchschnittliche Durchflussgeschwindigkeiten in ml/min während der einzelnen Versuchsdurchführungen.....	22
Tabelle 7: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit UW Lösung.....	24
Tabelle 8: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit DMEM Nährlösung.....	26
Tabelle 9: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) bei Perfusion mit NaCl.....	27
Tabelle 10: Ermittelte Extinktion in Arbeitseinheiten der einzelnen Präparate im proximalen bzw. distalen Bereich zum Zeitpunkt 0 (T0), nach 240 Minuten (T1) und nach 480 Minuten (T2) ohne jegliche Perfusion	29

Tabelle 11: Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung 0 = NaCl, 1 = UW Lösung, 2 = DMEM Nährlösung, 3 = Nicht perfundiert, T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz.....	31
Tabelle 12: Übersichtstabelle zur Varianzanalyse ohne Ermittlung einer Signifikanz zwischen den Gruppen. Angegeben sind die Mittelwerte der Extinktionswerte sowie die Referenzbereiche in Klammern. T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min., p = Signifikanz.....	32
Tabelle 13: t-Test bei allen Gruppen (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min. T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler...	32
Tabelle 14: t-Test bei Gruppe „NaCl“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min. T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler...	32
Tabelle 15: t-Test bei Gruppe „UW Lösung“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min., T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler.....	33
Tabelle 16: t-Test bei Gruppe „DMEM Nährlösung“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min. T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler.....	33
Tabelle 17: t-Test bei Gruppe „Nicht perfundiert“ (proximal vs. distal) mit T0 = 0min., T1 = 240min., T2 = 480min. T = Test-Statistik, DF = Freiheitsgrade, p = Signifikanz, MD = Mittlere Differenz, SE = Standardfehler.....	33

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AE	Arbeitseinheiten
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ca.	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DIEP	Deep Inferior Epigastric Perforator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Euro-Collins
ECLA	Extracorporeal Lung Assist
ECLS	Extracorporeal Life Support
ECMO	Extracorporeal Membrane Oxygenation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii/aliae/alia (und andere)
FVI	Flap Viability Index
g/l	Gramm pro Liter
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
IL-8	Interleukin 8
KLF2	Kruppel-like Factor 2
LKG	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
M.	Musculus

mg/l	Milligramm pro Liter
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
ml/min	Milliliter pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mosmol/kg	Milliosmol pro Kilogramm
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTS	Methylthiazolsulfophenyl
μl	Mikroliter
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
o.g.	oben genannt
PMS	Phenazinmethosulfat
PVC	Polyvinylchlorid
PVK	peripherer Venenkatheter
s.	siehe
sog.	sogenannte
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
UW	University of Wisconsin
V.	Vena
VA	veno-arteriell
VV	veno-venös

8 Veröffentlichung

Wolff, K. D., Ritschl, L. M., von Bomhard, A., Braun, C., **Wolff, C.**, Fichter, A. M. (2020). In vivo perfusion of free skin flaps using extracorporeal membrane oxygenation. *J Craniomaxillofac Surg*, 48(1), 90-97. doi:10.1016/j.jcms.2019.12.005

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich noch bei einigen Menschen bedanken, ohne die die erfolgreiche Fertigstellung dieser Dissertation so nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Univ.- Prof. Dr. Deppe, meinem Doktorvater und Betreuer, der stets mit Ruhe und einzigartiger Professionalität sowie mit seinem mir vorbehaltlos entgegengebrachtem Vertrauen, die Umsetzung der neuartigen und experimentellen Arbeit unterstützte, begleitete und somit erst ermöglichte. Zudem möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Wolff für seine zukunftsorientierten und visionären Ideen sowie die vielfältig zur Verfügung stehenden Forschungsmöglichkeiten in seiner Abteilung bedanken.

Meinem Mentor Priv.-Doz. Dr. Dr. Achim von Bomhard möchte ich für die wertvollen Tipps und Hinweise für die Planung und Durchführung, insbesondere der laborchemischen Untersuchungen, ausdrücklich danken. Ohne seine Erfahrung und sein experimentelles Wissen wäre die Umsetzung der Arbeit nicht in diesem Umfang möglich gewesen.

Dr. Dr. Alexander Wick danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten. Als guter Freund und Fachkollege erleichterte er mir durch seine Hilfestellung die Fertigstellung der Arbeit enorm.

Den stets bemühten und immer gut gelaunten Mitarbeitern des Schlachthofs München danke ich für die unkomplizierte und zuverlässige Kooperation. Durch ihre Mitarbeit und Hilfe können nicht nur Forschungsprojekte wie dieses, sondern auch praktische Lehrveranstaltungen für Studierende realisiert werden.

Und zu guter Letzt will ich meiner Familie danken, insbesondere meiner wundervollen Ehefrau Fabienna, die mich jederzeit unterstützte, immer ein offenes Ohr für Sorgen und Probleme hatte und mich zum Durchhalten motivierte. Vielen Dank!