



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffes Indocyanin-Grün (ICG) zur Evaluation onkologisch- experimentalchirurgischer Ansätze am Groß- und Kleintiermodell

Christian Heiliger

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

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer*innen der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 27.02.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2023 angenommen.

Publikationsbasierte Promotion

Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffes

Indocyanin-Grün (ICG) zur Evaluation onkologisch-

experimentalchirurgischer Ansätze

am Groß- und Kleintiermodell

von

Christian Heiliger

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Mücke, sowie allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe der MKG-Chirurgie der TUM, für die ausgezeichnete Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Konrad Karcz für seinen unermüdlichen Enthusiasmus und seine ansteckende Begeisterungsfähigkeit.

Auch bei den Tierärztinnen und Tierärzten und allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und die fürsorgliche Betreuung der Versuchstiere bedanken.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich zudem meiner Familie, meinen Freunden und meiner Lebensgefährtin Lena für die Begleitung durch die Zeit der Promotion danken.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

PUBLIKATIONSLISTE

1. Einleitung	10
<i>Entwicklung des klinischen Einsatzes von ICG</i>	10
<i>Pharmakochemische und pharmakokinetische Eigenschaften</i>	11
Bindungseigenschaften und hepatische Clearance	11
Photodynamische Eigenschaften	12
<i>Chirurgische Anwendungsbereiche</i>	13
<i>Applikationsarten von ICG</i>	16
<i>Experimentelle Nutzung von ICG zur Bewertung von neuartigen freien venösen Lappen-Plastiken</i>	17
<i>Darstellung embryonaler Grenzschichten im Rahmen der onkologischen Rektum Chirurgie mittels ICG</i>	19
2. Material und Methoden	21
<i>ICG-Bildgebung in der rekonstruktiven Chirurgie am Kleintiermodell (Ratte)</i>	21
Tiermodell	21
Chirurgisches Verfahren	21
Versuchsgruppen	25
ICG-Videoangiographie	26
Planimetrische Messung der nekrotischen Bereiche	27
Statistik	28
<i>ICG-Bildgebung zur Färbung embryologischer Trennschichten im Rahmen onkologischer Rektum Resektionen am Großtiermodell (Schwein)</i>	29
Tiermodell	29
Chirurgischer Eingriff und laparoskopische ICG-Videoangiographie	29
3. Diskussion	32
4. Publikationen	41

5. Zusammenfassung der Veröffentlichungen	56
<i>Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model³³</i>	56
<i>Conditioning of microvascular venous flaps in rats</i>	57
6. Genehmigung des Herausgebers zur Vervielfältigung der enthaltenen Artikel	58
7. Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb	Abbildung
AMI	Arteria mesenterica inferior
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
CT	Computertomographie
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
FDA	Federal Drug Administration
FBS	Fetal bovines Serum
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
ICG	Indocyanin-Grün
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
nm	Nanometer
NIR	Naher Infrarotbereich
PDT	Photodynamische Therapie
PME	Partielle mesorektale Exzision
PPIX	Protoporphyrin IX
s.c.	Subkutan
SWIR	Kurzwellige Infrarot-Fluoreszenz
Tab	Tabelle
TME	Totale mesorektale Exzision
v _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Zusammenfassung

Bei Indocyanin-Grün (ICG) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher Licht im nahen Infrarotbereich (NIR) bei einer Wellenlänge von 700 bis 900 nm absorbiert und emittiert, für den Patienten kaum bis nicht-toxisch und nicht-ionisierend ist, fast ausschließlich biliär ausgeschieden wird, für das menschliche Auge nicht sichtbar ist und somit die Sicht des Chirurgen auf das Operationsfeld nicht verändert. Neben einer Übersicht über die Entwicklungsgeschichte des klinischen Einsatzes von ICG, werden aktuelle Einsatzbereiche und verschiedenen Applikationsmethoden von ICG vorgestellt. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit ICG in zwei explorativen Tierversuchen zur Etablierung möglicher neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren genutzt.

In einer Studie an vier Schweinen wurde zunächst untersucht, ob es möglich ist, die embryonalen-onkologischen Resektionsschichten bei der totalen mesorektalen Exzision von Rektumkarzinomen mit Hilfe einer intraarteriellen ICG-Färbung über eine Katheterisierung der Arteria mesenterica inferior (AMI) zu visualisieren. Es zeigte sich ein Fluoreszenzsignal in allen versorgten Bereichen der AMI, sowie eine scharfe Grenze zwischen gefärbtem und nicht gefärbtem Gewebe des Mesorektums, sodass onkologisch-embryologische Resektionsgrenzen anhand der ICG-Perfusion bestimmt werden können.

In einem weiteren Experiment wurde ein neues Verfahren zur Nutzung von venösen freien Lappentransplantaten untersucht. Rein venöse Perfusionslappen werden aufgrund der hohen Ausfallrate nicht häufig verwendet. Ziel dieser Studie war es, die Überlebensraten im Zusammenhang mit einem rein venösen, jedoch ischämisch präkonditionierten Perfusionslappen zu bewerten und zu untersuchen ob der Zeitpunkt der Gefäßkonditionierung das Überleben des freien Lappens beeinflussen kann. An vierundvierzig Ratten wurden venös-arterielle Anastomosen mit epigastrischen Transplantaten mit rein venöser Perfusion mit und

ohne Gewebekonditionierung durchgeführt. Diese Gruppen wurden mit einer Kontrollgruppe aus konventionell perfundierten Lappen verglichen. Nach der ersten Operation wurden alle Lappen klinisch, photometrisch und mittels ICG-Videoangiographie untersucht. Es zeigten sich signifikante Unterschiede, sowohl in der Erfolgsrate des Lappenüberlebens als auch in den durchgeführten angiographischen Indices.

Es konnte gezeigt werden, dass bei geeigneter Konditionierung eine rein venöse Blutversorgung eine angemessene Perfusion im epigastrischen Lappenmodell der Ratte gewährleisten kann, wobei der Zeitpunkt der Gefäßkonditionierung für das Überleben des Lappens entscheidend zu sein scheint.

ICG-Bildgebung ist eine einfache, kostengünstige und klinisch zugelassene Methode, welche intraoperative Echtzeit-Bildgebung ermöglicht. Die zunehmende Integration von Infrarotkameras sowohl in OP-Mikroskope, Endoskope und Laparoskope ermöglicht eine breite Verwendung der Methodik auch im klinischen Alltag. Doch auch wenn der Einsatz zunehmend propagiert wird, sich beginnende Evidenz zum Einsatz von ICG abzeichnet und sich quantitative Soft- und Hardwaretools zur quantifizierten Beurteilung etablieren, so variieren die Quantifizierungsmethoden noch sehr stark. Eine Standardisierung der Quantifizierungsmethoden und der Datenerfassung ist unerlässlich und muss weiter vorangetrieben werden, um eine weitere evidenzbasierte Integration der ICG-Nutzung in den klinischen Alltag zu ermöglichen. Nichtsdestotrotz bietet NIR-Bildgebung sowohl für die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieverfahren, als auch für die Weiterentwicklung der navigierten Chirurgie, ein großes Potential.

Publikationsliste

- **Heiliger C**, Ritschl LM, Fichter AM, Postl LK, Kanatas A, Wolff KD, Mücke T.

Conditioning of microvascular venous flaps in rats.

Sci Rep. 2023 Jan 19;13(1):1029. doi: 10.1038/s41598-023-28054-9. PMID: 36658326

- **Heiliger C**, Piecuch J, Frank A, Andrade D, Von Ehrlich-Treuenstätt V, Schiergens T, Rentsch M, Werner J, Karcz K.

Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model.

Minim Invasive Ther Allied Technol. 2019 Dec;28(6):321-325.

doi: 10.1080/13645706.2018.1544568. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30442057.

1. Einleitung

Entwicklung des klinischen Einsatzes von ICG

ICG ist ein Polymethinfarbstoff der während des zweiten Weltkrieges als photographischer Farbstoff genutzt wurde, bevor er in der Neurologie ¹, Kardiologie, Hepatologie, Nephrologie und Augenheilkunde als diagnostisches Hilfsmittel verwendet wurde ².

Die klinische Nutzung des Farbstoffes ICG fand ihren Ursprung in der Augenheilkunde, in welcher 1958 das erste Mal die Nutzung von ICG in der retinalen Angiographie am Tier ³, und nach dem FDA-Approval (1958), 1960 die Nutzung am Menschen dokumentiert ist ⁴. Diese Entdeckung führte zu umfangreichen Neuerungen bei der Diagnose von chorioretinalen Erkrankungen. In den folgenden Jahren wurde der Farbstoff auch zur Messung des Herzzeitvolumens in der Kardiologie und zur Clearance Messung in der Hepatologie genutzt. Aufgrund von technologischen Limitationen kam es zunächst zu einer stagnierenden Nutzung und Weiterentwicklung des Farbstoffes, bis die Verbesserung digitaler Möglichkeiten in den frühen 2000er Jahren eine deutliche Verbreitung der Nutzung mit sich zog ⁵.

Seit den 2010er Jahren wächst die Anzahl der wissenschaftlichen Veröffentlichung zum Thema Indocyanin-Grün exponentiell, nicht zuletzt durch neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene und dem immer wichtiger werdenden Bereich der Image-Guided-Surgery ⁶.

Die Vorteile liegen auf der Hand: Da es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff handelt, welcher Licht im nahen Infrarotbereich bei einer Wellenlänge von 700 bis 900 nm absorbiert und emittiert, ist eine hohe Gewebedurchdringung bis zu einigen Zentimetern Tiefe möglich, zudem wird durch die geringe Autofluoreszenz von biologischem Gewebe ein ausreichender Kontrast erzielt⁷. ICG ist außerdem für den Patienten kaum bis nicht-toxisch und nicht-ionisierend und wird fast ausschließlich biliär ausgeschieden. Positiv ist zudem, dass NIR-Wellenlängen für das

menschliche Auge nicht sichtbar sind und somit die Sicht des Chirurgen auf das Operationsfeld nicht verändern ⁸.

Pharmakochemische und pharmakokinetische Eigenschaften

ICG (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): sodium; 4-[(2Z)-2-[(2E,4E,6E)-7-[1,1-dimethyl-3-(4-sulfonatobutyl)benzo[e]indol-3-ium-2-yl]hepta-2,4,6-trienylidene]-1,1-dimethylbenzo[e]indol-3-yl]butane-1-sulfonate) ist ein Tricarbocyaninfarbstoff, der in der Medizin als Diagnosefarbstoff verwendet wird. Seine chemische Formel lautet $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$ bei einem Molekulargewicht von 774,96 Da (= g/ mol).

ICG ist in Pulverform stabil und wird zur Injektion bei Menschen in max. 5 % Natriumjodid gelöst ⁹. Es ist löslich in Wasser, aber weniger löslich in Ethanol. Ethanol führt jedoch zur hellsten Lösung, während Wasser die Helligkeit deutlich verringert. Das photophysikalische Verhalten von ICG ist in Vollblut und fetal bovinem Serum (FBS) sehr ähnlich und ist im Serum deutlich heller und photostabiler als in Wasser ⁹.

Außerdem zeigten Lagerstabilitätsstudien, dass die deuterierten Versionen von ICG mit Deuteriumatomen an der Heptamethinkette „[D5]-ICG“ und „[D7]-ICG“ eine verlängerte Lagerungseigenschaften aufweisen, was vor allem die fluoreszenzgesteuerte Chirurgie und deren biomedizinischen Bildgebungs- und Diagnoseverfahren verbessern kann ¹⁰.

Bindungseigenschaften und hepatische Clearance

Während ICG in Verbindung mit Proteinen im Blutkreislauf relativ stabil ist, neigt es in wässriger Lösung zu einer photochemischen oxidativen Dimerisierungsreaktion bei der ein nicht fluoreszierendes Produkt entsteht, so dass klinische Dosen kurz nach der Rekonstitution

verwendet werden müssen.¹⁰ Der Farbstoff ist amphiphil und kann deshalb sowohl mit lipophilen als auch hydrophilen Molekularspezies interagieren¹¹. 98 % des injizierten ICG bindet über seine lipophile Komponente intravaskulär an den hydrophoben Teil der Plasmaproteine, vor allem an Serumalbumin sowie Alpha- und Beta-Lipoproteine, die den größten Teil des Bolus bis zur hepatischen Aufnahme und Ausscheidung in die Galle im intravaskulären Raum einschließen. Die restlichen zwei Prozent liegen frei im Serum vor. Die Wechselwirkungen zwischen ICG und Plasmaproteinen führen nicht zu einer Veränderung der Proteinstruktur, sondern zu einer nichttoxischen Grenzstruktur, die den Vorteil der geringen Extravasation von ICG erklärt.^{8,10,11,12}

Die lipophile Eigenschaft von ICG führt zu einer Aufnahme in hepatische Parenchymzellen von 18 bis 24% Serum-ICG pro Minute und somit zu der fast vollständigen biliären Ausscheidung. Dies erklärt die rasche Eliminierung des Farbstoffs aus dem Blutkreislauf in 10-20 min nach einer intravenösen Injektion und die plasmatische Halbwertszeit des Farbstoffes, die von der Vaskularisierung des jeweiligen Organes abhängig ist und im Mittel bei 3 bis 4 Minuten liegt¹². Eine weitere wichtige Eigenschaft im Gegenzug zu anderen färbenden Substanzen in der Image-Guided-Surgery ist, dass dank einer schnellen Ausscheidung der Farbstoff während eines Eingriffs für mehrere Injektionen verwendet werden kann. Die v_{max} des Abtransports liegt beim Menschen bei 3,6 mg/kg/min, wobei sie bei Leberzirrhose und anderen Leberkrankheiten abnimmt¹².

Photodynamische Eigenschaften

Die Indocyanin-Grün-Fluoreszenz weist einen hohen Kontrast und eine hohe Empfindlichkeit auf, da das zur Messung der Fluoreszenz verwendete Licht im nahen Infrarotbereich das Gewebe durchsichtiger erscheinen lässt und mehrere Millimeter mehr in das Gewebe eindringt

als bei anderen Wellenlängen. Eine Anregung des Moleküls erfolgt innerhalb des NIR-I Fensters (~600 bis 900 nm) von 750 bis 800 nm, und die Fluoreszenz wird um die Emissionsspitze bei 832 nm herum betrachtet ^{7,8,12}.

Wie schon 2012 Hong et al. im Kleinterversuch zeigen konnten, liefert die SWIR bzw. NIR-II-Bildgebung gleichzeitig anatomische und hämodynamische Informationen und macht den Einsatz mehrerer Bildgebungsmodalitäten überflüssig, um gleichwertige Daten zu erhalten. Dies lässt sich damit erklären, dass die Gewebestreueung geringer ist und NIR-II bei kürzeren Wellenlängen (~1000 bis 2000 nm) tiefer in die Anatomie eindringt ¹³. So werden die Einsatzmöglichkeiten von ICG auch weiterhin zunehmen, denn wie Byrd et al. beschreibt, konnte 2019 zum ersten Mal die Darstellung kurzweiliger Infrarot-Fluoreszenz (SWIR) an einem Großtier beschrieben werden. Die überlegene Auflösung, das geringere Hintergrundsignal und die Robustheit gegenüber Blutansammlungen, die in den SWIR-Bildern beobachtet wurden, stellen entscheidende Verbesserungen für angiographische und andere fluoreszenzgesteuerte Eingriffe dar und sichern die tragende und zukunftsfähige Rolle von ICG in der Fluoreszenz-Guided-Surgery ¹⁴.

Chirurgische Anwendungsbereiche

ICG wird heutzutage in zahlreichen medizinischen Disziplinen angewandt, wobei im Folgenden vor allem auf ausgewählte chirurgische Anwendungsbereiche eingegangen werden soll. ICG kann generell beides: Sowohl Informationen zur Pathologie aufzeigen als auch vitales und perfundiertes Gewebe darstellen.

In der Augenheilkunde wird ICG genutzt, um Netzhaut- und Aderhautanomalien oder Krankheiten sichtbar zu machen, z.B. bei der altersbedingten Makuladegeneration oder inflammatorischen Prozessen. Des Weiteren kann es z.B. bei der photodynamischen Therapie (PDT) für bestimmte Arten der Makuladegeneration eingesetzt werden. ICG akkumuliert in Gefäßtumoren und mittels hochenergetischen Lichts wird bei ICG-Stimulation so ein Gefäßschaden und Verschluss der Tumore induziert.^{15,16}

In der Neurochirurgie wird ICG vor allem bei cerebrovaskuläre Prozeduren verwendet, um deren intraoperativen Erfolg zu validieren. Es wird zum Beispiel zur Angiographie, sowohl bei der Resektion von Gefäßmalformationen arterio-venösen Ursprungs oder Aneurysmen, als auch bei extrakranial-intrakranieller Bypass-Chirurgie eingesetzt. Als Vorteil gegenüber der intraoperativen DSA (Digitale Subtraktionsangiographie) gilt die kurze Zeitspanne von 2 min von Injektion zu Beurteilung der Gefäßsituation. So kann z.B. eine kritische ischämische Situation ausgelöst durch Clip-Fehlsetzung bei Aneurysma-Operationen sofort erkannt und durch sofortige Clip-Neusetzung die Perfusion schnellstmöglich verbessert werden. Neben ICG werden zusätzlich 5-ALA (5-Aminolävulinsäure) - auch bekannt als Fluoreszein, und PPIX (Protoporphyrin IX) genutzt.¹⁷⁻¹⁹

In der Gynäkologie und Urologie wird ICG zur Sentinel-Lymphknotenbiopsie, zur Kontrolle auf Tumorfreiheit der Resektionsränder sowie zur Prophylaxe von Lymphödemen und Resektionsplanung bei Lymphknotendissektion eingesetzt. Wobei ICG unmittelbar um den Tumor injiziert wird, um so entsprechend drainierende Lymphknoten anzufärben^{20,21}.

Die Anwendung im operativen Bereich der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde wird vor allem bei der Tumordetektion und Lymphknotenresektion im Halsbereich beschrieben²². Aber auch zur

Darstellung der tumorversorgenden Gefäße zur intraarteriellen Chemotherapie zeigt ICG vielversprechende Ergebnisse gegenüber konventioneller CT-Bildgebung²³.

In der Chirurgie kann Indocyanin-Grün neben der Darstellung von Lymphknoten, der intraoperativen Visualisierung von Gewebepfusion und zur Kontrolle von Anastomosen²⁴ im speziellen auch zum Mapping von Lymphknoten bei laparoskopischer Resektionen²⁵, zur Visualisierung von Lebersegmenten durch selektive intrahepatische Injektion und wie im Rahmen unserer Experimente beschrieben, zur Visualisierung embryonaler Resektionsgrenzen eingesetzt werden. Aufgrund der biliären Anreicherung kann ICG dazu genutzt werden, Gallenwege und insbesondere das Calot'sche Dreieck mit seinen Varianten darzustellen und die Sicherheit einer Operation zu verbessern. Hierzu wird ICG vor dem Eingriff intravenös appliziert, sodass sich nachfolgend die ableitenden Gallenwege färben²⁶.

Aufgrund verschiedener ICG-Resorption- und Sekretionsverhalten reichert sich ICG unterschiedlich im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe an und kann somit eine Tumordarstellung, z.B. zur Beurteilung von Tumorausdehnung, sowie von okkulten Metastasen dienen.^{27,28} Zur Detektion von Sentinel Lymphknoten wird ICG ebenfalls in der Tumorchirurgie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt.²⁹

Die intraurethrale Injektion von ICG kann zum Beispiel hilfreich sein, um iatrogene Verletzungen des Harnleiters während eines beckenchirurgischen Eingriffs zu verhindern. Hierbei kann beispielsweise zu Beginn einer robotischen Operation die Spitze eines Ureter-Katheters eingebracht und ICG, in 10 ml sterilem Wasser gelöst, über den offenen Katheter appliziert werden. Durch Bindung des ICGs an Proteine der Urothelschicht, wurden die Ureteren reversibel über die Dauer der Operation angefärbt und so iatrogene Verletzungen durch eine Echtzeit-Darstellung der Ureteren vorgebeugt.³⁰

In der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie wird ICG z.B. präoperativ im Rahmen eines Lappen-Perfusions-Assessments via ICG-Angiographie oder auch zum Staging von chronischen sekundären Lymphödemen, oder im Rahmen von Lymphographien zur Detektion lymphatischer Bahnen genutzt. Intraoperativ wird es u.a. im Rahmen der Mikrochirurgie und zum Sentinel-Lymphknoten-Mapping bei Brustkrebs oder Melanomen, sowie zu intraoperativen Lappenperfusion und Anastomosenbeurteilung von freien oder gestielten Lappen genutzt.

Applikationsarten von ICG

Applikationsart	Anwendungsbeispiele
Intravenös	<ul style="list-style-type: none"> ■ Perfusionsdarstellung von Gewebe, z.B. nach Anastomosen ²⁴ oder Transplantatperfusion ³¹ ■ Darstellung von Gefäßanastomosen ³¹ ■ Tumordarstellung ^{22,27,28} ■ Darstellung der Gallengangsanatomie ²⁶ ■ Quantifizierung der Leberfunktion ³² ■ Darstellung von Gefäßanomalien ¹⁶
Intraarteriell	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detektion von tumorspeisenden Gefäßen für intraarterielle Chemotherapie ²³ ■ Darstellung von Resektionsgrenzen, z.B. superselektive Lebersegmentdarstellung, embryonale Grenzschichten ^{33,34,35} ■ Darstellung von intrakraniellen arteriovenösen Malformationen ³⁶ ■ Detektion von unklaren gastrointestinale Blutungen ³⁷ ■ Darstellung der peripheren Durchblutung bei peripher-arterieller Verschlusskrankheit ³⁸

Intraluminal	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ureterdarstellung ³⁰ ■ Leckagetestung z.B. im Rahmen einer Sleeve-Gastrektomie ³⁹
Peritumoral	<ul style="list-style-type: none"> ■ Intraluminale Tumor-Färbung zur Tumorlokalisierung ⁴⁰ ■ Lymphknoten Mapping ^{20,21}
Gefärbte Fremdkörper	<ul style="list-style-type: none"> ■ ICG-markierte endoskopische Clips zur Tumorlokalisierung ⁴¹ ■ ICG-markierte Ureterstents zur intraoperativen Ureterdarstellung ⁴²

Tabelle 1. Übersicht über die verschiedenen Applikationsarten von ICG, sowie entsprechende Anwendungsbeispiele.

Experimentelle Nutzung von ICG zur Bewertung von neuartigen freien venösen Lappen-Plastiken

Die Fortschritte im Bereich des freien Gewebetransfers haben die rekonstruktive Mikrochirurgie deutlich verändert. Freie Lappen sind die beste Rekonstruktionsmöglichkeit nach größeren operativen Eingriffen an Kopf und Hals, der übliche mikrovaskuläre Gewebetransfer ist jedoch in seltenen Fällen nicht möglich.⁴³ Zu den Herausforderungen gehören rezidivierende Tumorerkrankungen, vorangegangene Hals-Dissektionen und vorangegangene adjuvante oder radikale Strahlentherapien des Halsbereichs. In einigen Fällen ist eine Operation die einzige in Frage kommende Behandlungsmethode, wobei die eingeschränkte Verfügbarkeit oder die schlechte Qualität von Blutgefäßen am Hals die Komplikationsrate erhöht.⁴⁴⁻⁴⁷ Bei diesen Patienten könnten sich der Status der Halsgefäße auf die Heilungschancen auswirken, insbesondere wenn die Operation zu einer Funktionseinschränkung führt.⁴⁸ In Ermangelung geeigneter Arterien könnte die venöse

Perfusion eine Alternative für die Weichteilrekonstruktion darstellen. Auch wenn die venösen Gefäße in der klinischen Praxis oft limitierenden Faktoren sind, könnten arterialisierte venöse "Durchfluss"-Lappen eine zusätzliche Rekonstruktionsoption darstellen. Auch eine sekundäre venöse Perfusion über die arteriellen Gefäße des Lappens wäre im Rahmen von Rescue-Operationen denkbar. Im Falle einer Mehrgefäßversorgung könnte auch der geeignete Einsatz venöser Verbindungsgefäße die chirurgischen Möglichkeiten erweitern.

Darüber hinaus könnte das Verständnis der zugrundeliegenden physiologischen Veränderungen bei der Konditionierung zu weiteren Verbesserungen bei der freien Lappentransplantation führen. Arterialisierte venöse "Durchfluss"-Lappen wurden zur Deckung kleiner Weichteildefekte am Finger verwendet; der Erfolg rein venöser Lappen ist jedoch schwer vorhersehbar, und es kommt häufig zu Lappenversagen oder partiellen Lappennekrosen ^{25,49-53}. Ein rein venöser Perfusionsansatz hat in der Vergangenheit keine zufriedenstellenden Ergebnisse gezeigt, weshalb verschiedene Konzepte zur Verbesserung der Überlebensrate venöser Lappen beschrieben wurden. Dazu gehören Verfahren zur chirurgischen Verzögerung ^{50,54} oder die Prä-arterialisierung von venösen Lappen ^{55,56}. Die chirurgische Delay-Technik ist der Vorläufer der modernen Präkonditionierungstechniken. Klinisch wurden arterialisierte venöse Lappen verwendet ^{49-52,57-62}; diese haben sich jedoch noch nicht für die Rekonstruktion komplexer Defekte etabliert ^{63,64}.

Ziel dieser Studie war es, einen Lappen mit venösem Blut über die Arterie zu perfundieren, ähnlich wie bei arterialisierten venösen Lappen ^{50,60-62}, und die Überlebensdauer des Lappens bei Präkonditionierung zu untersuchen. In dieser Studie wurde die efferente Vene retrograd prä-arterialisiert und der Lappen mit einem ischämischen Delay-Verfahren ^{50,54,65,66}

präkonditioniert, um eine ausreichende Durchblutung des Gewebetransplantats mit venösem Blut nach der Gewebetransplantation sicherzustellen.

Darstellung embryonaler Grenzschichten im Rahmen der onkologischen Rektum Chirurgie mittels ICG

Seit Heald et al. in den 1980er Jahren gezeigt haben, dass die totale mesorektale Exzision (TME) das Lokalrezidiv des kolorektalen Karzinoms reduziert, wird die TME bei Karzinomen des mittleren und unteren Rektumdrittels und die partielle mesorektale Exzision (PME) bei Karzinomen des oberen Rektumdrittels in den meisten klinischen Leitlinien empfohlen ^{67,68,69,70}.

Eine korrekte mesorektale Exzision entlang der anatomischen Ebene zwischen Fascia pelvis visceralis und Fascia pelvis parietalis ist entscheidend für die onkologische Qualität der Resektion ⁶⁷.

In dieser Pilot-Tierstudie haben wir untersucht, ob es möglich ist, die embryonalen Resektionsschichten mit Hilfe einer intraarteriellen ICG-Färbung sichtbar zu machen.

Zwei Drittel des Rektums liegen extraperitoneal und sind vom Mesorektum umgeben, welches Blutgefäße und Lymphknoten enthält und die häufigste Lokalisation von lymphogenen Metastasen und mikroskopischen Tumorzellen darstellt. Die lymphogene Metastasierung des Rektums erfolgt entlang der Arterien. 75 % der lymphatischen Metastasierung von Rektum-Tumoren werden im Mesorektum, 19 % im Bereich der Arteria rectalis superior, 0,9 % an der Abzweigung der Arteria mesenterica inferior und 4,4 % im Bereich der Arteria sigmoidea gefunden ^{69,71}.

Bei der Durchführung eines so genannten medio-lateralen Zugangs ist die Gefäßligatur der A. mesenterica inferior einer der ersten Schritte bei der onkologischen Hemikolektomie oder Rektumresektion. Nach der Identifizierung des linken Harnleiters und der Durchtrennung der seitlichen Peritonealansätze wird das Rektum oder Kolon reseziert. Mehrere Studien belegen eine Reihe von Vorteilen dieses medialen Zugangs⁷².

In unserer Pilotstudie an einem Schweinmodell haben wir ICG in die AMI injiziert, um zu sehen, ob der Grenzverlauf der arteriellen Versorgungszone durch Fluoreszenzbildgebung ausreichend sichtbar gemacht werden kann, um den richtigen Dissektionsbereich entlang der Fascia parietalis vor und während der Resektion zu markieren.

Unsere Hypothese ist, dass diese Technik die onkologische Qualität der Resektion verbessern kann, indem sie die Operation unterstützt. Das Ziel dieser Pilotstudie war es, die Durchführbarkeit der laparoskopischen Resektion entlang der embryonalen Schichten zu untersuchen und inwieweit die Durchführbarkeit der bildgesteuerten laparoskopischen Identifizierung des Resektionsbereichs des Mesorektums mit ICG-Darstellung möglich ist.

2. Material und Methoden

ICG-Bildgebung in der rekonstruktiven Chirurgie am Kleintiermodell (Ratte)

Tiermodell

Insgesamt 51 männliche Wistar-Ratten (280-320 g; Fa. Charles River; Kißlegg, Deutschland) wurden in dieser Studie verwendet. Alle Verfahren wurden in strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen und Leitlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt, die von der lokalen Ethikkommission für Tierversuche (Regierung von Oberbayern, AZ55.2-1-54-2532-129-10) der Technischen Universität vollständig genehmigt wurden. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der ARRIVE-Richtlinie durchgeführt. Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Alle chirurgischen Eingriffe wurden aseptisch unter intravenöser Allgemeinanästhesie mit Ketamin 100 mg/kg (Narketan[®], Fa. Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) und Xylazin 5 mg/kg (Rompun[®], Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) durchgeführt, wie an anderer Stelle beschrieben⁷³. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um das Leiden der Tiere so minimal wie möglich zu halten.

Chirurgisches Verfahren

Der epigastrische Lappen wurde als gestielter Lappen auf der Basis des epigastrischen Stiels aus dem tiefen inferioren Gefäßsystem mit einer standardisierten Größe von 4x7 cm angehoben, wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben^{74,75}. Die Operation wurde mit einem OPMI[®] Pentero[®] Mikroskop durchgeführt, das mit einem integrierten Nahinfrarot-Videoangiographie-Detektionssystem und dem FLOW 800 Tool (INFRARED 800, Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet war, um anschließend das Fluoreszenzverhalten im Zeitverlauf und die Richtung des Blutflusses nach den Anastomosen zu analysieren.

Katheterisierung der Oberschenkelvene

Nach der Präparation der rechten Oberschenkelgefäße wurde die Vena femoralis durch eine Längsvenotomie distal des Leistenbandes katheterisiert. Der Katheter wurde mit temporären Gefäßklemmen distal der Venotomie gesichert. Aufgrund der wiederholten Katheterisierung wurden die Gefäßclips entfernt und die Venotomie nach jedem Eingriff mit Nähten verschlossen.

Venös-arterielle Anastomose

Der Zugang zu den epigastrischen Gefäßen erfolgte über einen 3-4 cm langen linken Leistenschnitt. Nach Präparation und Isolierung der Oberschenkelgefäße wurden die Seitenäste ligiert und die epigastrischen Gefäße 1-2 cm distal der Oberschenkelwurzel disseziert. Zur Vorbereitung der Anastomose wurden die Vena femoralis distal der Vena epigastrica und die Arterie proximal der Arteria epigastrica ligiert. Die Arteria epigastrica sowie ein kurzes Segment der distalen Arteria femoralis wurden Ende-zu-Ende mit dem distalen Teil der Vena femoralis anastomosiert. Die Kontinuität der Arteria femoralis wurde durch Anastomosierung des proximalen und distalen Teils der Arteria femoralis wiederhergestellt (Abb. 1 und 2).

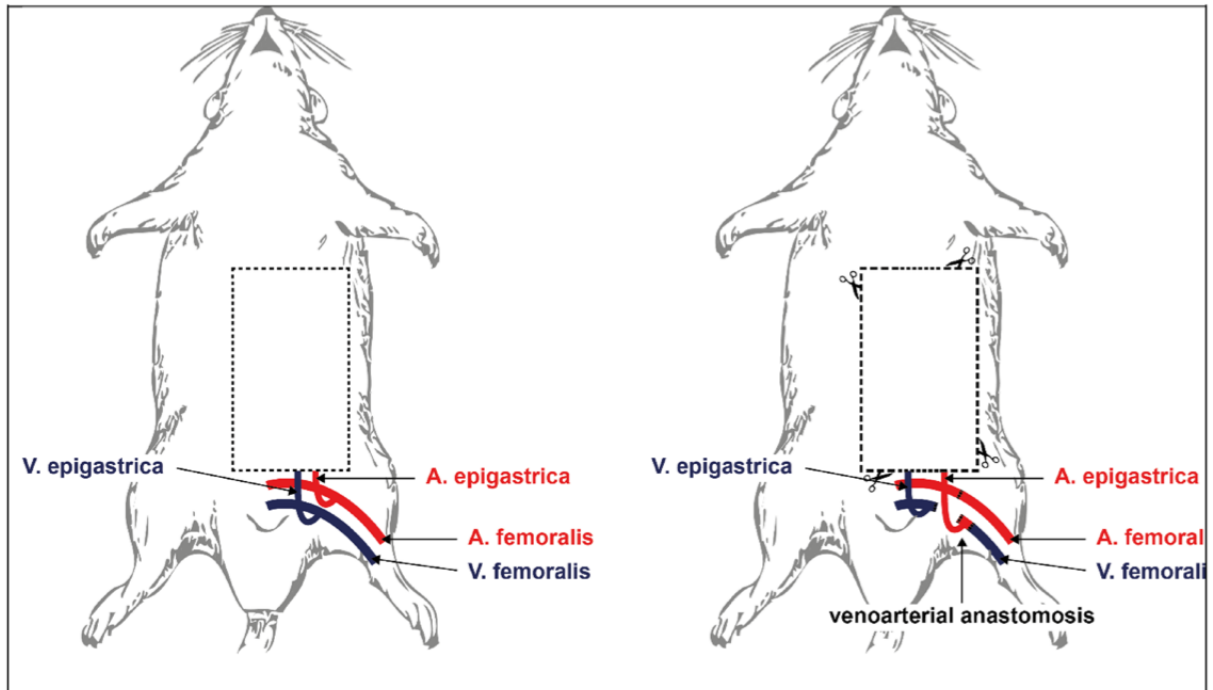


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Versuchsmodells.

Die Vena femoralis wurde distal der Vena epigastrica und die Arteria femoralis proximal der Arteria epigastrica ligiert. Die Arteria epigastrica wurde zusammen mit einem distalen Teil der Arteria femoralis mit der distalen Vena femoralis anastomosiert. Eine Anastomose des proximalen und distalen Teils der Arteria femoralis wurde ebenfalls durchgeführt.

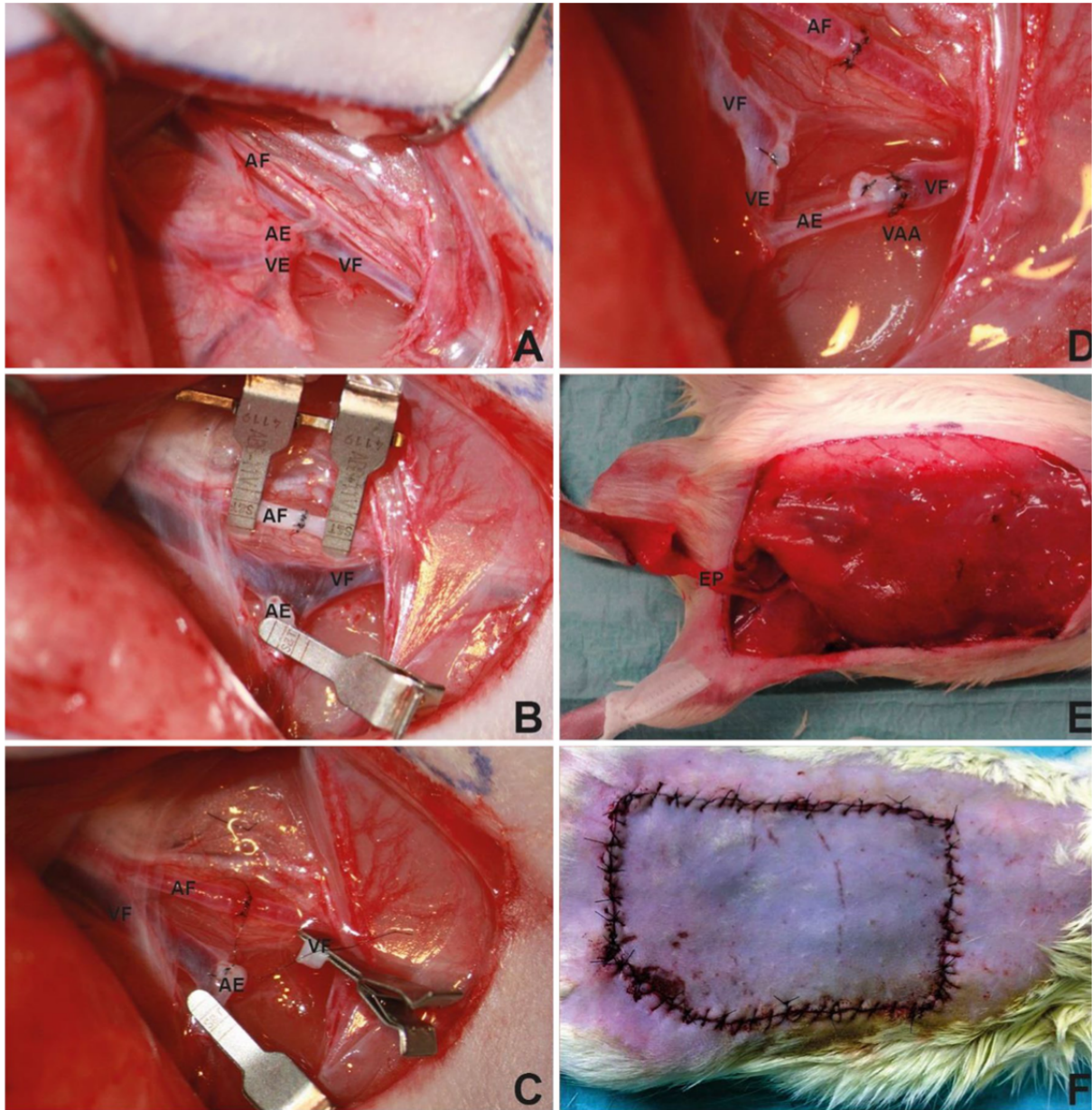


Abbildung 2. Klinische Situation des chirurgischen Eingriffs.

(A) Oberschenkelarterie und -Vene mit den epigastrischen Ästen. (B) Durchtrennte epigastrische Gefäße mit ihrem femoralen Ursprung und reanastomosierte Arteria femoralis. (C) Die reperfundierte Arteria femoralis, der ligierte Ast der proximalen Vena femoralis und die erste Naht der distalen Vena femoralis. (D) Anastomose zwischen der distalen Vena femoralis und der Arteria epigastrica. Die distale Vena femoralis weist eine arterielle Rotfärbung auf, die durch den retrograden arteriellen Zufluss aus der Arteria mammaria erklärt werden kann. (E) Hochgezogener Lappen, der jetzt nur noch von den epigastrischen Gefäßen durchblutet wird. (F) In das Wundbett zurückgenähter Lappen in Gruppe III (+ 14 d). AF-arteria femoralis; AE-

arteria epigastrica; EP-epigastrischer Pedikel; VF-vena femoralis; VE-vena epigastrica; VAA-veno-arterielle Anastomose.

Versuchsgruppen

Alle Ratten wurden anhand einer computergenerierten Liste randomisiert und in vier Gruppen (je n=11) eingeteilt, die drei Versuchsgruppen (I-III) und eine Kontrollgruppe (IV) umfassten. Nach einem strengen Protokoll wurde für jede Gruppe eine andere Technik durchgeführt (Tab. 2). Gruppe I umfasste Ratten mit einer veno-arteriellen Anastomose ohne Vorkonditionierung: Der epigastrische Lappen wurde angehoben, und es wurde ein rein venöses Perfusionssystem aufgebaut. Am selben Tag wurde der Lappen wieder in den epigastrischen Defekt eingenäht (Abb. 1). In Gruppe II wurde eine venös-arterielle Anastomose konstruiert, der Lappen jedoch angehoben und sieben Tage später wieder in den epigastrischen Defekt eingesetzt, um eine Präkonditionierung zu realisieren. In Gruppe III wurde eine ähnliche rein venöse Perfusion konstruiert, aber der Lappen wurde angehoben und nach einem Intervall von 14 Tagen zurückgesetzt, um eine längere Präkonditionierungszeit zu erreichen. In der Kontrollgruppe (IV) wurde ein standardmäßiger arterieller epigastrischer Lappen (basierend auf dem epigastrischen Stiel) angehoben, die epigastrische Arterie mit ihrem femoralen Ursprung wurde durchtrennt und reanastomosiert, und der Lappen wurde direkt in den epigastrischen Defekt zurückeingenäht.

Alle Lappen wurden sieben Tage nach Anheben beurteilt (Tab. 2).

Group #	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21
I (+0 d)	Veno-arterial anastomosis and flap raising	Euthanasia and flap assessment		
II (+7 d)	Veno-arterial anastomosis	Flap raising	Euthanasia and flap assessment	
III (+14 d)	Veno-arterial anastomosis		Flap raising	Euthanasia and flap assessment
IV-controlgroup (+0 d)	Arterial anastomosis and flap raising	Euthanasia and flap assessment		

Table 2. *Versuchsprotokoll für die verschiedenen Gruppen (n = 11 Ratten pro Gruppe).*

Die Gruppen I-III umfassten Ratten mit einer veno-arteriellen Anastomose. Gruppe I umfasste Ratten mit einer veno-arteriellen Anastomose ohne Vorkonditionierung: Der epigastrische Lappen wurde gehoben, und es wurde ein rein venöses Perfusionssystem etabliert. Am selben Tag wurde der Lappen wieder in den epigastrischen Defekt eingenäht (Abb. 1). In Gruppe II wurde eine venös-arterielle Anastomose angelegt, der Lappen jedoch erst sieben Tage später nach Vorkonditionierung in den epigastrischen Defekt gehoben. In Gruppe III wurde eine ähnliche rein venöse Perfusion konstruiert, aber der Lappen wurde erst nach einem Intervall von 14 Tagen gehoben, um eine längere Vorkonditionierungszeit zu erreichen. In der Kontrollgruppe (IV) wurde ein standardmäßiger arterieller epigastrischer Lappen (basierend auf dem epigastrischen Stiel) gehoben, die epigastrische Arterie mit ihrem femoralen Ursprung durchtrennt und wieder anastomosiert, und der Lappen wurde direkt in den epigastrischen Defekt zurückeingenäht. Alle Lappen wurden sieben Tage nach Anheben des Lappens beurteilt.

ICG-Videoangiographie

Neben der Beobachtung der Lappenfarbe, der Kapillarfüllung, des Blutverlustes und der Palpation der Anastomose wurde eine ICG-Videoangiographie durchgeführt, um das Fluoreszenzverhalten und die Blutflussrichtung im Lappen zu beschreiben und die Durchgängigkeit der mikrovaskulären Anastomosen kritisch zu beurteilen. Dazu wurde ICG (ICG-PULSION, Pulsion Medical Systems AG; München, Deutschland) intravenös injiziert und das integrierte Fluoreszenzbildgebungsgerät des Mikroskops (OPMI® Pentero®, Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland) genutzt. Das Bildgebungsgerät wurde senkrecht über dem

Operationsfeld mit einem standardisierten Abstand von 30 cm zentriert positioniert. Zur Beurteilung der Anastomose und des Lappens wurde bei jedem Versuch und nach jedem chirurgischen Schritt (veno-arterielle Anastomose, Lappenhebung und Lappenbeurteilung) eine ICG-Videoangiographie durchgeführt. Zunächst wurde eine Angiographie des Lappens, dann eine weitere Angiographie der Anastomose durchgeführt. Das ICG (0,3 mg/kg Körpergewicht, 25 mg gelöst in 5 ml sterilem Wasser) wurde intravenös als Bolus in den zentralen Venenkatheter injiziert. Das Fluoreszenzsignal wurde auf dem Videobildschirm in Echtzeit (25 Bilder/Sekunde) visualisiert und unmittelbar nach der Farbstoffinjektion für 80 Sekunden aufgezeichnet, wie zuvor beschrieben ⁷⁶. Die mittlere ICG-Intensität des Lappens wurde wie zuvor beschrieben analysiert ⁷⁶.

Die morphometrische angiografische Analyse des vaskulären Netzwerks wurde mit einer von Takeshita et al. beschriebenen Methode durchgeführt ⁷⁷. Ein Verbund aus 5 mm² großen Gittern wurde über den Lappenbereich gelegt. Die Gesamtzahl der Gitterabschnitte und der von einem ICG-gefärbten Gefäß durchquerten Abschnitte wurden von einem Beobachter, der gegenüber dem Behandlungsschema verblindet war, einzeln gezählt. Für jede ICG-Angiografie wurde ein ICG-Gefäß-Score berechnet, der sich aus dem Verhältnis der von Gefäßen durchkreuzten Gitterabschnitte zur Gesamtzahl der Gitterabschnitte im Lappen ergab ⁷⁶. Außerdem wurde die Zeit von der Injektion bis zum ersten ICG-Signal im Lappen aufgezeichnet.

Planimetrische Messung der nekrotischen Bereiche

Sieben Tage nach dem Anheben und Zurücksetzen des Lappens wurden alle Ratten betäubt, und die Lappenheilung wurde mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Nikon Coolpix 8700, Nikon Corp., Chiyoda, Tokio, Japan) dokumentiert, die mit einem Stativ senkrecht auf den Lappen gerichtet war. Die vitalen und nekrotischen Bereiche auf den Bildern wurden analysiert.

So wurden die Gesamtfläche des Lappens und die nekrotischen Bereiche manuell mit einem Grafikprogramm umschrieben, und die Querschnittsfläche wurde mit der NIH Image Software (Image J 1.41; National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) ⁷⁸ berechnet.

Statistik

Alle Beobachtungen wurden unabhängig voneinander von zwei Untersuchern ausgewertet, die gegenüber den Versuchsgruppen verblindet waren. Für die grundlegende statistische Analyse wurde Prism 7 für Mac OS X Version 7.0a (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Für die multivariate Analyse wurde die IBM SPSS Statistics für Windows Version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet. Die Nekroserate und die mittlere ICG-Intensität des Lappens wurden mit Hilfe der gewöhnlichen einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bewertet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Mittelwerte und Standardabweichung (SD) wurden verwendet, um die Flutungsgeschwindigkeit des ICG-Signals im Lappen zu beschreiben. Die Zeit von der ICG-Injektion bis zum Nachweis des ICG-Signals im Lappen und im vaskulären Netzwerk wurde mit Hilfe einer gewöhnlichen Einweg-ANOVA bewertet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Der Tukey-Mehrfachvergleichstest wurde verwendet, um dem Problem der Mehrfachtests Rechnung zu tragen. Bei einem zweiseitigen p-Wert von $<0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben.

ICG-Bildgebung zur Färbung embryologischer Trennschichten im Rahmen onkologischer Rektum Resektionen am Großtiermodell (Schwein)

Tiermodell

Insgesamt wurden vier Schweine (Gewicht 35-40 kg, Alter 3-4 Monate) in dieser Nichtüberlebensstudie verwendet. Alle Verfahren wurden in strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen und Leitlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt, die von der örtlichen Ethikkommission für Tierversuche (FIM-18-105) vollständig genehmigt wurden. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Azaperon (Stresnil) i.m. (2mg/kg) in Kombination mit Atropin s.c. (0,02-0,1 mg/kg) und Ketamin 10% i.m. (20 mg/kg). Die Narkose wurde mit 2% Isofluran, Pancuronium, Meloxicam, Metamizol, Ketamin und gegebenenfalls Fentanyl aufrechterhalten. Am Ende des Verfahrens wurden die Tiere auf humane Weise durch eine intravenöse Injektion einer tödlichen Dosis von T61 getötet.

Chirurgischer Eingriff und laparoskopische ICG-Videoangiographie

Der chirurgische Zugang erfolgte auf folgende Weise: Die AMI wurde nach einer Standard-Mittellinien-Laparatomie vorbereitet. Nach der proximalen Ligatur wurde eine Punktion der AMI mit einer 18-Gauge-IV-Leitung durchgeführt, an die ein extrakorporaler Schlauch (Vasofix Braunüle, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde eine zweite Ligatur weiter distal angelegt, um die Infusionsleitung zu fixieren und die Arterie am retrograden Fluss zu hindern (Abb. 3). Nach diesem Schritt wurde die Bauchdecke vorübergehend verschlossen.

Ein Trokar für eine Laparoskopiekamera und zwei Trokare für Instrumente wurden in den Unterbauch eingeführt und ein Kapnoperitoneum in Standardverfahren angelegt. Nach Auffinden des Rektums einschließlich des Mesorektums wurde ICG mittels des Katheters in die AMI appliziert. Zu diesem Zweck wurde eine kontinuierliche intra-arterielle Perfusion über eine ICG-Spritzenpumpe hergestellt. Die ICG-Konzentration (PULSION Medical Systems SE, Feldkirchen, Deutschland) betrug 0,025mg/ml gemischt mit Aqua ad iniectabilia mit einer Perfusionsrate von 1 ml/min und einem Gesamtvolumen von 50ml. Die Fluoreszenzbildgebung wurde mit einer infrarotempfindlichen Vier-Chip-Laparoskopiekamera (Maxer Medizintechnik GmbH, Spaichingen, Deutschland) beobachtet. Mit Hilfe dieser Kamera konnten wir das ICG-Fluoreszenzbild überlappend zum realen Kamerabild beobachten, indem wir das Infrarotsignal grün einfärbten und in Echtzeit mit dem Videosignal des Laparoscops überlagerten. Daher ist eine manuelle Umschaltung von einem normalen Video auf das NIR-Signal nicht notwendig, auch wenn sie manuell erfolgen kann.

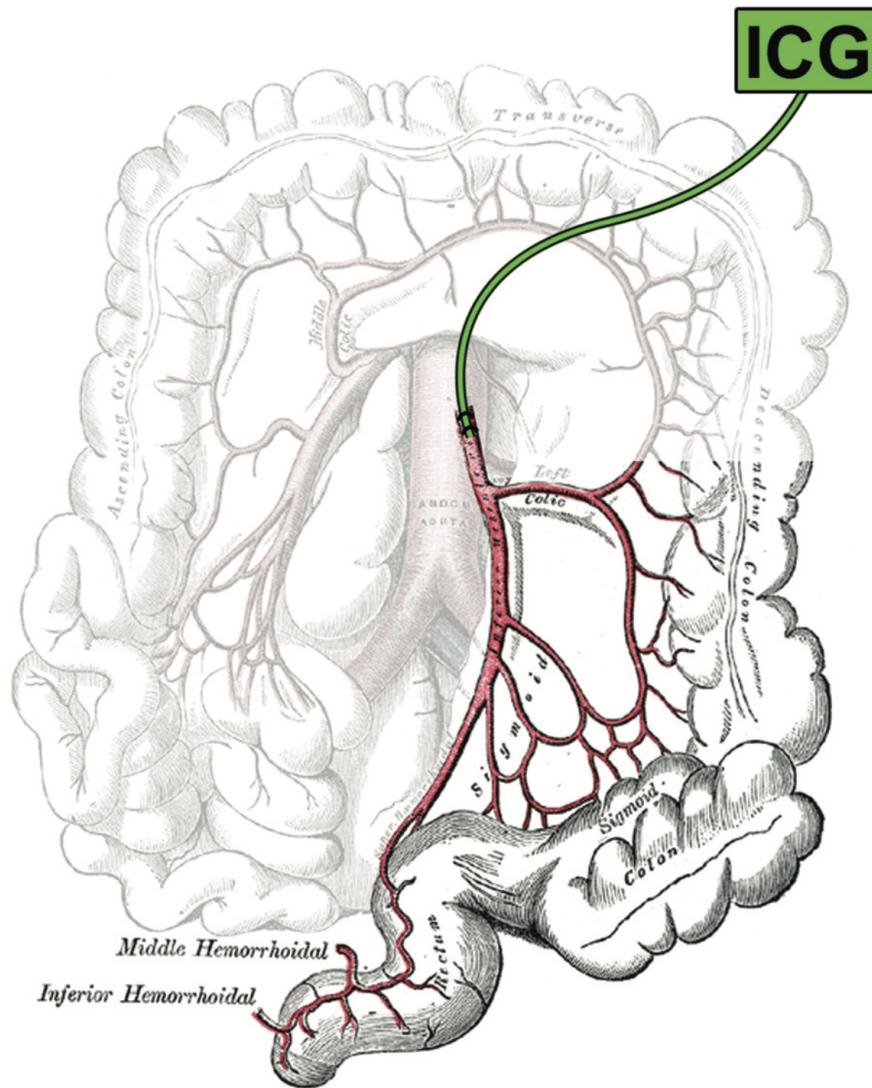


Abbildung 3. Kontinuierliche intra-arterielle Perfusion mit ICG (0,025 mg/ml pro Minute) in die Arteria mesenterica inferior (Henry Gray (1918) *Anatomy of the Human Body* - modifizierte Abbildung).

3. Diskussion

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, findet ICG bereits heute einen breiten Einsatz in der klinischen Routine. Doch auch für Forschungsfragestellungen ist die Anwendung von ICG vielversprechend und kann sowohl als Methode, als auch selbst im Forschungsmittelpunkt stehen. Nachfolgend sollen die beiden Experimente sowie die Ergebnisse der Versuche diskutiert werden. Zum einen der Einsatz von ICG zur Evaluation und Deskription im Rahmen der Präkonditionierung freier Lappen mit venöser Lappen-Perfusion am Rattenmodell, zum anderen in der Explorationsstudie, in der onkologisch-embryologische Kompartimente bei einer Rektumresektion visualisiert wurden.

Venöse Lappen unterscheiden sich von herkömmlichen mikrovaskulären freien Lappen. Normalerweise werden venöse Lappen vollständig durch das venöse System perfundiert, einschließlich eines venösen Zu- und Abflusses. Im vorliegenden Modell wurde der Zufluss beibehalten, aber die arterielle Seite der Gefäße wurde durch den Zufluss von venösem Blut ersetzt. In diesem Rattenmodell wurden übergroße Lappen gehoben, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen besser auszuarbeiten und zu bewerten. Es zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Gefäßkonditionierung ein wichtiger Aspekt für das Gesamtüberleben dieser Lappen ist. Außerdem scheint die Dauer der Lappenkonditionierung ein entscheidender Faktor für das Überleben des Lappens zu sein. Die Fluoreszenzangiographie unmittelbar nach dem Anheben des Lappens zeigte signifikant bessere ICG-Intensitäten in Gruppe III als in Gruppe II. Obwohl es am Ende der Studie keine höhere ICG-Intensität zwischen Gruppe II und III gab, wurde klinisch ein signifikant besseres Lappenüberleben bei längerer Konditionierung in Gruppe III als in Gruppe II beobachtet. Die Anflutung von ICG in den Lappen

war in Gruppe III schneller als in Gruppe II, ebenso wie eine höhere Dichte des Kapillarnetzes, was ebenfalls ein positiver Effekt der längeren Konditionierung zu sein scheint.

Der Effekt kann auf eine anfänglich bessere Durchblutung der Lappen zurückgeführt werden, und eine längere Konditionierung erscheint sinnvoll. In dieser Studie können Weichgewebelappen mit rein venöser Blutversorgung ausreichend perfundiert werden. Bisher wurden venöse Gewebelappen hauptsächlich bei der Rekonstruktion von Fingern oder Zehen eingesetzt ^{49,61,62}. Diese Defekte sind in der Regel relativ klein, und venöse Lappen werden für die Rekonstruktion funktionell wichtiger Regionen ausgewählt, in denen Spalthaut- oder Ganzhauttransplantate zu viel Narbenbildung verursachen und die funktionellen Ergebnisse stark beeinträchtigen könnten ^{49,61,62}. Einige Autoren bezeichnen venöse Lappen als "venöse Hauttransplantate" ⁷⁹, da der epitheliale Teil des Lappens meist eine Nekrose erfährt. In unserem Experiment konnten wir diese Beobachtung nicht bestätigen, da das Epithel in dem gut durchbluteten Bereich nicht nekrotisch war. Yoshimura et al. ⁷⁹ anastomosierten distale Venen des Lappens mit Arterien, um die Oxygenierung innerhalb des Lappens zu erhöhen, was in 12 von 13 Fällen erfolgreich war; allerdings wiesen alle Lappen partielle Nekrosen auf. Thatte et al. beschrieben rein venös perfundierte Lappen, die zu einer Überlebensraten von 0-30 % führten ⁸⁰, während arterialisierte venöse Lappen Überlebensraten von etwa 75 % aufwiesen, vergleichbar mit der Gruppe III in dieser Studie ^{52,81}. Obwohl arterialisierte venöse Lappen bisher die besten Ergebnisse gezeigt haben, zeigte die vorliegende Technik ähnliche Ergebnisse, die einen neuen Aspekt in der Verwendung venöser Gewebetransplantate enthalten, wenn keine arterielle Verbindung vorhanden ist. Dieser Effekt könnte eine neue Möglichkeit für die Verwendung von venösen Weichgewebelappen darstellen. Die Konditionierung des Gefäßsystems und des Lappens könnte in einer kurzen vorbereitenden Operation vor der eigentlichen Rekonstruktion durchgeführt werden. Dieser vorteilhafte Konditionierungsschritt

könnte im ersten operativen Schritt erfolgen, da in vielen Kliniken nach entsprechender Tumorentfernung eine sekundäre Rekonstruktion (zweizeitiges Vorgehen) durchgeführt wird, wenn die histologische Untersuchung eines resezierten Tumors erfolgt ist^{82,83}. Die qualitativen Ergebnisse der intraoperativen ICG-Videoangiographie in der vorliegenden Studie zeigten, dass die sofortige Verlegung der Gefäßversorgung des Lappens in ein venöses System ohne Vorkonditionierung nicht zu einer ausreichenden Lappenperfusion führte. Bei der fluoreszenzangiographischen Untersuchung in den zweizeitigen Verfahren der Gruppen II und III wurden im Allgemeinen eine ausreichende Lappenperfusion und ein kontinuierlicher Blutfluss durch die Anastomosen beobachtet. Darüber hinaus wurde in beiden vorkonditionierten Lappengruppen in der ICG-Videoangiographie eine verstärkte Vaskularisierung festgestellt, die durch eine höhere Dichte des Gefäßnetzes dargestellt wurde. In Anbetracht der klinischen Ergebnisse, die sich in den Überlebensraten widerspiegeln, wurde angenommen, dass sich der Kreislauf innerhalb des Lappens an den Blutdruck des venösen Systems auf der arteriellen Seite des Lappens anpasst. Interessanterweise traten keine Abflussprobleme auf, was auf den geringeren venösen Zufluss zurückzuführen sein könnte und als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen könnte. Darüber hinaus war das Gefäßnetz nach der Herstellung des Blutflusses über 14 Tage (Gruppe III) im Vergleich zur Vaskularisierung nach sieben Tagen (Gruppe II) und unmittelbar nach der Herstellung der veno-arteriellen Anastomose (Gruppe I) angiographisch gut durchblutet. Der vorliegende Mechanismus deutet auf ein "hämodynamisches Remodeling" hin, da sich die Perfusion im Laufe der Zeit verändert und anpasst. Im Gegensatz zu arterialisierten venösen Lappen, wie sie in der Literatur beschrieben sind, wird bei diesem Remodeling-Typ die arterielle Hochdruckperfusion in eine Niederdruckperfusion umgewandelt, die physiologischer zu sein scheint. Der neue veno-arterielle Blutfluss ist physiologisch konstant und unidirektional⁸⁴.

Diese Effekte zeigen den physiologischen Umbau des arteriellen Gefäßsystems, das sich an den konstanten und sauerstoffarmen venösen Blutfluss angepasst hat⁸⁵. Ähnlich wie bei anderen Versuchen^{50,66,85-87} hat diese Studie gezeigt, dass in der Konditionierung von Transplantaten ein großes Potenzial steckt, obwohl die physiologischen Grundlagen noch nicht umfassend verstanden sind. Ob die ischämische Konditionierung des Transplantats oder die arterielle retrograde Gefäßkonditionierung für die Überlebensrate verantwortlich ist, sollte weiterhin untersucht werden. Darüber hinaus sollte erforscht werden, ob die retrograde Perfusion im Sinne eines veno-venösen Lappens mit entsprechender Konditionierung zu einem gleichen, besseren oder schlechteren Lappenüberleben führt. So könnte weiter evaluiert werden, ob Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im Zweifel sekundär sind und das Gefäßsystem und das entsprechende hämodynamische Remodeling nicht primär entscheidend für das Lappenüberleben sind. Inwieweit diese experimentelle Form der freien Lappen eine echte Alternative im klinischen Einsatz darstellen könnte, muss in Folgeexperimenten untersucht werden, zumal venöse Verbindungsgefäße unter kritischen Bedingungen oft fehlen. In unserem Experiment wurde ICG periphervenös appliziert und zum einen zur Darstellung des Blutflusses über die neu geschaffenen Perfusionswege genutzt, zum anderen zur Perfusionsdarstellung des transplantierten freien Lappens. Dies diente zur deskriptiven Beschreibung und konnte weiterhin zur quantitativen Bewertung hinsichtlich ICG-Anflutungszeit, durchschnittlichen ICG-Intensität und zur Bestimmung der Dichte des vaskulären Netzwerkes je nach Interventionsgruppe genutzt werden. In unserem Rattenmodell für epigastrische Lappen können freie Lappen mit rein venöser Blutversorgung ausreichend perfundiert werden. Der Zeitpunkt der vaskulären Konditionierung erwies sich als ein wichtiger Schritt für das Gesamtüberleben dieser Lappen. Außerdem scheint die Dauer der Lappenkonditionierung ein entscheidender Faktor für das Überleben des Lappens zu sein. Ob die ischämische

Konditionierung des Transplantats oder die arterielle retrograde Gefäßkonditionierung für die Überlebensrate verantwortlich ist, muss noch untersucht werden.

In der nachfolgenden Studie wurde ICG nun über einen Katheter intraarteriell in ein Zielgefäß eingebracht, um dort onkologisch-embryologische Grenzschichten im Rahmen von Rektum-Resektionen zu visualisieren.

In der kolorektalen Chirurgie ist der Einsatz von ICG ein vielversprechendes Instrument zur Verbesserung der Genauigkeit und der Ergebnisse bei einer zunehmenden Zahl von Indikationen⁸⁸. Mehrere Studien untersuchten die Anastomosenperfusion nach kolorektaler Resektion und zeigten, dass die Echtzeit-Bildgebung dazu beitragen kann, die Ursache einer Insuffizienz zu ermitteln, bevor sie auftritt⁸⁸⁻⁹⁰. Diana et al. legten bei 13 Schweinen ein Dünndarm-Ischämiesegment an und zeigten, dass es eine starke Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und biochemischen Markern für Ischämie gibt⁸⁹. Andere Wissenschaftler wie Nishigori et al. zeigten, dass die intravenöse und submukosale Injektion von ICG dem Chirurgen detaillierte Informationen über den Lymph- und Blutfluss liefern kann⁹¹. Weitere Indikationen für den Einsatz von ICG in der Abdominalchirurgie, wie z.B. Lymphknoten-Mapping, intraabdominelle Sentinel-Lymphknoten Markierung bei Melanomen, Visualisierung der biliären Anatomie, Identifikation der vaskulären Anatomie oder zur Identifizierung von Lebertumoren, sind ebenfalls beschrieben^{92,93}.

In der Literaturrecherche mit den folgenden Suchbegriffen: 'icg mesenteric', 'indocyanine green mesenteric', 'icg intra arterial', 'indocyanine green intra arterial', war unsere die erste Beschreibung dieser Technik. Es gibt ähnliche Experimente mit intraarterieller ICG-Färbung, jedoch ohne die Idee, die Resektionsgrenzen zu markieren. Liu et al. führten eine Studie an elf

Schweinen durch, um die Durchführbarkeit der Echtzeit-Fluoreszenzangiographie durch intraarterielle ICG-Injektion in mesenteriale Äste zur Identifizierung unklarer gastrointestinaler Blutungsbereiche zu bewerten ³⁷. In einem Fallbericht von Ono et al. wird die intraoperative Lokalisierung einer arteriovenösen Malformation im Jejunum eines 95-jährigen Mannes durch den kombinierten Einsatz von angiographischen Methoden und Indocyanin-Grün-Injektion beschrieben ³⁶. Ryu et al. beschrieben eine kolorektale Krebsoperation bei einem Patienten, bei der die Fluoreszenzangiographie zur Bestimmung des Einzugsgebiets der Arteria rectalis superior nach Resektion des Rektums von der Analseite aus eingesetzt wurde ⁹⁴. Sie injizierten ICG nach der Resektion, um den Blutfluss vor der Anastomose und Bereiche mit potenzieller Ischämie zu beurteilen. Die Idee war hier ähnlich, allerdings wurde die ICG-Fluoreszenzbildgebung nicht zur Identifizierung der Resektionsgrenzen verwendet, was wahrscheinlich auf starke technische Einschränkungen zurückzuführen war. Im Vergleich zu dieser Studie stellen wir vor, dass die Resektionsgrenzen vor der Resektion anhand der ICG-Perfusion bestimmt werden können.

In dieser Machbarkeitsstudie haben wir gezeigt, dass eine intraoperative exklusive Färbung des Rektums einschließlich des Mesorektums möglich ist. Mit einer überlappenden infrarotempfindlichen Laparoskopiekamera können wir die Resektionsgrenze deutlich darstellen, indem wir das Ende der ICG-Fluoreszenz am Mesokolon identifizieren. Mit einer kontinuierlichen Flussrate über einen Perfusor konnten wir eine kontinuierliche Perfusion bis zum Perfusionsbereich der A. rectalis superior über die A. mesenterica inferior darstellen. Eine Einschränkung dieser Studie ist die Verwendung der Laparotomie zur Punktion der AMI. Eine weitere Einschränkung ist, dass wir nicht die Zeit gemessen haben, bis nach der anfänglichen Perfusion keine Fluoreszenz mehr nachweisbar war. Da wir jedoch primär die Leber und die Ausscheidung in die Galle durch die Hepatozyten umgehen, die mehr als 95 % des ICG innerhalb

von 15 Minuten verstoffwechseln, schätzten wir eine verlängerte Fluoreszenz in der von der AMI perfundierten Gewebeprobe ^{26,92,95}. Wir konnten beobachten, dass es eine Stunde nach der Perfusion keinen Unterschied in der subjektiven Fluoreszenzintensität im Rektalschlauch gab.

Weitere Studien müssen sich mit einigen wichtigen Fragen befassen: Was passiert während intraoperativen Blutungen und entsprechenden Kontaminationen und wie stört die Koagulation des Gewebes (z. B. des Mesorektums) das Fluoreszenzbild? Natürlich kann ICG die Bauchhöhle kontaminieren, so dass die Fluoreszenz-Laparoskopie nicht mehr sinnvoll ist. Eine weitere Frage ist, ob die vaskuläre Anatomie des menschlichen Körpers und die retrograde Perfusion eine ausreichende ICG-Färbung des Rektums verhindern können. Außerdem sollten prospektive randomisierte Studien durchgeführt werden, um zu zeigen, ob es einen Unterschied in der Qualität der Resektion nach der MERCURY-Klassifikation ⁶⁹, der Größe der Resektion und den Komplikationen im Vergleich zu den derzeitigen offenen oder laparoskopischen Operationsverfahren gibt.

Die ICG-Perfusion und die überlappende Echtzeit-Fluoreszenz-Laparoskopie könnte Chirurgen dabei helfen, sicherere und bessere Operationen durchzuführen, indem sie die embryonale Resektionsgrenzen und die Organdurchblutung klar erkennen. Die Visualisierung der Resektionsgrenzen anhand der ICG-Perfusion vor dem ersten Schnitt könnte einen neuen Ansatz in der onkologischen Chirurgie darstellen. Weitere Studien sollten die Vorteile der fluoreszenzgesteuerten Operationstechnik verifizieren.

ICG-Bildgebung ist ein einfaches, kostengünstiges und klinisch zugelassenes Verfahren, welches intraoperative Echtzeit-Bildgebung ermöglicht. Die zunehmende Integration von

Infrarotkameras sowohl in OP-Mikroskopen, Endoskopen und Laparoskopie ermöglicht eine breite Verwendung der Methodik auch im klinischen Alltag. Aktuelle Metaanalysen und Consensus-Paper empfehlen mittlerweile den Einsatz von ICG bei vielfältigen Indikationen, wie z.B. bei der laparoskopischen Cholezystektomie, zur Perfusionsbeurteilung in der kolorektalen Chirurgie und für die Suche nach Sentinel-Lymphknoten bei gynäkologischen Malignomen ⁹⁶. Des Weiteren gibt es Empfehlungen zum Einsatz von ICG-Visualisierung bei avitalem Weichgewebe, bei freien Lappenrekonstruktionen, sowie zum Einsatz in der Transplantationschirurgie zur Senkung des Risikos einer Lappennekrose als auch zur Verringerung des Gesamtrisikos eines Transplantatversagens ³¹.

Doch auch wenn der Einsatz propagiert wird und sich beginnende Evidenz zum Einsatz von ICG abzeichnet, sich auch quantitative Soft- und Hardwaretools zur quantifizierten Beurteilung etablieren, so variieren die Quantifizierungsmethoden noch sehr stark, sodass eine Standardisierung der Quantifizierungsmethoden und der Datenerfassung unerlässlich ist und weiter vorangetrieben werden muss um die ICG-Nutzung in den klinischen Alltag weiter evidenzbasiert zu integrieren ⁹⁷.

Neben der Evaluation im klinischen Setting ist die NIR-Fluoreszenz-Bildgebung als präklinisches Instrument, wie in den hier vorgestellten Studien, zur Untersuchung von Krankheitsmechanismen und zur Erprobung neuer Methoden und Therapien vielversprechend. Eine der größten Herausforderungen stellt jedoch die begrenzte Eindringtiefe in das Gewebe, sowie die unspezifische Färbung von Tumoren oder Lymphknoten dar ⁹⁸.

Nanopartikel, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen beladen sind, oder fluoreszierende Antikörper-Konjugate, sind hier mögliche Lösungen, welche spezifische Anfärbungen von Tumoren ermöglichen ⁹⁸. Erste Federal Drug Administration (FDA) zugelassene Substanzen,

wie Pafolacianine (Cytalux™), sind bereits auf dem Markt, um beispielsweise überexprimierte Folsäurerezeptoren auf bösartigen Tumorzellen bei Ovarialtumoren intraoperativ zu visualisieren und so im Sinne von Präzisionschirurgie neue intraoperative chirurgische Therapiekonzepte zu ermöglichen ⁹⁹. Weitere Antikörper-Konjugate wie Bevacizumab-IRDye800CW sind ebenfalls in klinischen Studien untersucht, um Behandlungen von Patienten mit kolorektalen Peritonealmetastasen durch verbesserte Patientenauswahl und Optimierung der zytoreduktiven Chirurgie zu verbessern ^{100,98}.

Anti-CEA-Antikörper (SGM-101), welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, sollen die Erkennung und vollständige Resektion von CEA-positiven Tumoren verbessern, so wie zum Beispiel bei der Erkennung von kolorektalen und pankreatischen Lebermetastasen untersucht ¹⁰¹.

In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie wird beispielsweise Cetuximab-IRDye800CW verabreicht, um befallene Lymphknoten zu visualisieren und so das Resektionsausmaß unter Umständen anpassen zu können ¹⁰². In einer klinischen Studie von Rosenthal et al. mit einer Kohorte von zwölf Patienten mit metastasiertem Kopf-Hals-Tumor erzielte Cetuximab-IRDye800CW eine Sensitivität und Spezifität von über 95 % und ermöglichte damit die Resektion von Tumoren, die sonst von Operierenden übersehen wurden ^{102,102}.

Nah-Infrarot-Bildgebung bietet sowohl für die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieverfahren ein großes Potential als auch für die Weiterentwicklung der navigierten Chirurgie.

4. Publikationen



Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model

Christian Heiliger, Jerzy Piecuch, Alexander Frank, Dorian Andrade, Viktor Von Ehrlich-Treuenstätt, Tobias Schiergens, Markus Rentsch, Jens Werner & Konrad Karcz

To cite this article: Christian Heiliger, Jerzy Piecuch, Alexander Frank, Dorian Andrade, Viktor Von Ehrlich-Treuenstätt, Tobias Schiergens, Markus Rentsch, Jens Werner & Konrad Karcz (2019) Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model, *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 28:6, 321-325, DOI: [10.1080/13645706.2018.1544568](https://doi.org/10.1080/13645706.2018.1544568)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13645706.2018.1544568>



Published online: 15 Nov 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 162



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 5 View citing articles [↗](#)

Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model

Christian Heiliger^a, Jerzy Piecuch^b, Alexander Frank^a, Dorian Andrade^a, Viktor Von Ehrlich-Treuenstätt^a, Tobias Schiergens^a, Markus Rentsch^a, Jens Werner^a and Konrad Karcz^a

^aDepartment of General, Visceral, and Transplantation Surgery, Hospital of the LMU Munich, Ludwig-Maximilians-University (LMU), Munich, Germany; ^bKlinika Chirurgii Ogolnej, Metabolicznej i Medycyny Ratunkowej w Zabrze, Slaski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, Poland

ABSTRACT

Aim: In this pilot animal study we examined whether it is possible to visualize the embryonal resection layers by using intraarterial indocyanine green (ICG) staining when performing total mesorectal excision (TME) for carcinoma of the rectum. **Material and methods:** We injected ICG into the inferior mesenteric artery (AMI) of four swines to see whether the watershed area of the arterial supply zone can be sufficiently visualized by fluorescence imaging in order to mark the right dissection area along the fascia parietalis before and during resection. **Results:** We observed a fluorescence signal in all the supplied areas of AMI but not in other parts of the abdominal cavity or other organs. Additionally, the mesorectum also showed a sharp border between colored and non-colored tissue. **Conclusion:** In this study we present that resection borders may be determined before resection based on ICG-perfusion and we showed that intra-operative exclusive coloring of the rectum including the mesorectum is possible. Visualizing resection borders based on ICG-perfusion before settling the first cut may be a new approach in oncological surgery.

ARTICLE HISTORY

Received 19 July 2018
Accepted 4 October 2018

KEYWORDS

CRC; ICG; augmented reality; colorectal cancer; minimal invasive surgery; endoscopic surgery; guided surgery; TME

Introduction

Since Heald et al. showed in the 1980s that total mesorectal excision (TME) reduced local recurrence of colorectal cancer, TME for carcinoma of the middle and lower rectal third and partial mesorectal excision (PME) for the upper rectal thirds is recommended by most of the clinical practice guidelines [1–4]. A correct mesorectal excision along the anatomic plane between fascia pelvis visceralis and fascia pelvis parietalis is crucial for the oncological quality of the resection [3].

In this pilot animal study we examined whether it is possible to visualize the embryonal resection layers by using intraarterial indocyanine green (ICG) staining.

Two thirds of the rectum is extraperitoneal and surrounded by the mesorectum which includes vessels and lymphnodes and is the most common localization of lymphogenic metastasis and microscopic tumor-cells. Lymphogenic metastasis of the rectum happens along the arteries. 75% of lymphatic metastasis of rec-

tum carcinoma are found in the mesorectum, 19% around the superior rectal artery, 0.9% at the branch of the inferior mesenteric artery and 4.4% around the sigmoid arteries [4,5].

When performing a so called medial-to-lateral (M-L) approach, the high vessel ligation of the inferior mesenteric artery (AMI) is one of the first steps during oncological hemicolectomy or rectum resection. Following an identification of the left ureter and the division of the lateral peritoneal attachments, the rectum or colon is resected. Several studies support a number of advantages of this medial approach [6].

In our pilot study on a porcine model we injected ICG into the AMI to see whether the watershed area of the arterial supply zone can be sufficiently visualized by fluorescence imaging in order to mark the right dissection area along the fascia parietalis before and during resection.

Our hypothesis is that this technique can improve the oncological quality of the resection helping sur-

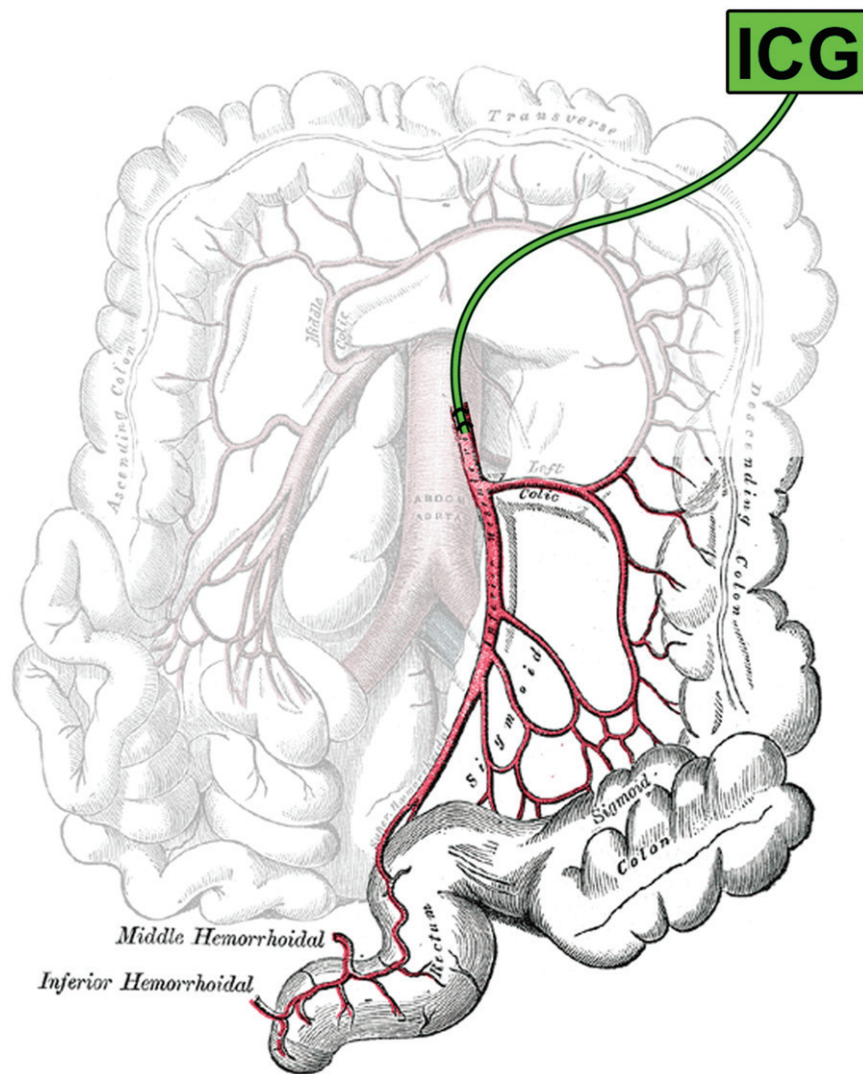


Figure 1. Continuous intra-arterial perfusion with ICG (0.025 mg/ml per minute) into the inferior mesenteric artery (Henry Gray (1918) *Anatomy of the Human Body* – modified illustration).

geons to identify the right embryonal plane, to avoid injuries of the left ureter, ovarian/testicular vein and neural structures of the pelvis. The aim of this pilot study was to assess the feasibility of image-guided laparoscopic identification of the resection area of the mesorectum with near-infrared angiographic enhancement.

Material and methods

Animals

A total of four swines (weight 35–40 kg, age 3–4 months) were used in this non-survival study. All procedures were carried out in strict accordance with the recommendations and guidance for the care and use of laboratory animals of the National Institutes of Health, which received full approval by the local Ethical Committee on Animal Experimentation (FIM-

18-105). Induction was achieved using Azaperon (Stresnil) i.m. (2 mg/kg) combined with Atropin s.c. (0.02–0.1 mg/kg) and Ketamin 10% i.m. (20 mg/kg). Anesthesia was maintained with 2% Isoflurane, Pancuronium, Meloxicam, Metamizole, Ketamine and if necessary Fentanyl. At the end of the procedure, animals were humanely killed with an intra-venous injection of a lethal dose of T61.

Surgical procedure and laparoscopic ICG video angiography

The surgical approach was performed in the following fashion. The AMI was prepared after standard mid-line laparotomy. After proximal ligation, a punctation of the AMI with a standard 18 gauge IV-line was implemented connecting an extracorporeal tube (Vasofix® Brauntile® B.Braun, Melsungen AG,

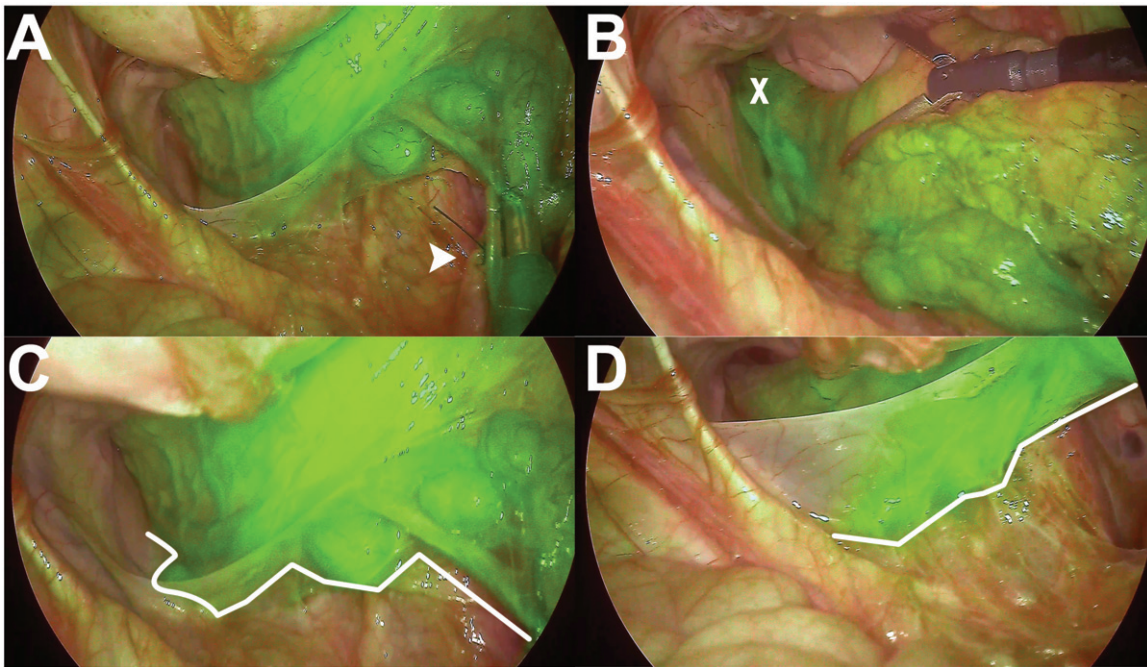


Figure 2. Laparoscopic view into the small pelvis from the left side. (a) The white arrow shows the punctured inferior mesenteric artery with the connected and ligated IV line. The rectal tube could be recognized with a strong fluorescence signal. (b) The 'x' shows the distal part of the rectum (c and d). You can see the sharp border (white line) between tissue with and without ICG signal. The border differentiates between the planes and defines the resection area. Notice how the fluorescence signal matches the right plane in real time during exposition of the situs.

Melsungen, Germany). Next, we tightened a prepared second ligature more distal to fixate the IV-line and to block the artery from retrograde flow (Figure 1). Following this step the abdominal wall was temporarily closed.

One trocar for a laparoscopy camera and two trocars for instruments were introduced into the lower abdomen and a capnoperitoneum was established in standard procedure. After locating the rectum including the mesorectum, ICG was applied into the AMI. For this purpose, we established a continuous intra-arterial perfusion via a syringe pump of ICG. ICG (PULSION Medical Systems SE, Feldkirchen, Germany) concentration was 0.025 mg/ml mixed with aqua ad iniectabilia with a perfusion rate of 1 ml/min and a total volume of 50 ml. Fluorescence imaging was observed via an infrared-sensitive four-chip laparoscopy camera (Maxer Medizintechnik GmbH, Spaichingen, Germany). With the use of this camera, we were able to observe the ICG-fluorescence image overlapping to the real camera image by staining the infrared signal green and overlaying it in real time onto the video signal from the laparoscope. Therefore, a manual switch from a normal video to the near infrared signal is not necessary, even if it can be done manually.

Results

After a Bolus of 10 ml and three minutes of continuous perfusion of the ICG-solution we observed a fluorescence signal in all supplied areas of AMI but not in other parts of the abdominal cavity or other organs. Fluorescence imaging was detected in the rectum up to the colon descendens (Figure 2(a,b)). Additionally, the mesorectum was also green-colored with a sharp border between colored and not-colored tissue (Figure 2(c,d)). We observed the fluorescence intermittently for one hour. During this period, we did not observe any subjective change in fluorescence intensity or diffusion of ICG to other organs or parts of the abdominal cavity. In previous experiments, we had contamination problems due to a lacking tube. In these cases other abdominal parts were colored which were not in focus. This might be an obvious limitation which can irritate during surgery.

Discussion

In colorectal surgery, the use of ICG is a promising tool to improve accuracy and outcome with an increasing number of indications [7]. Several studies investigated anastomosis perfusion after colorectal

resection and showed that real-time imaging may help to evaluate the cause of insufficiency before it occurs [7–9]. Diana et al. created a small bowel ischemic segment in 13 pigs and showed that there is a strong correlation between fluorescence intensity and biochemical markers for ischemia [8]. Other investigators such as Nishigori et al. showed that intravenous and submucosal injection of ICG can give the surgeon detailed information of lymph and blood flow [10]. Other indications for the use of ICG in abdominal surgery such as lymphatic mapping, intra-abdominal sentinel lymph node marking for melanoma, visualization of the biliary anatomy, clarifying the vascular anatomy or to identify hepatic tumors are described as well [11,12].

We performed a PUBMED literature review on November 11, 2017 with the following search terms: ‘icg mesenteric’ (42 results), ‘indocyanine green mesenteric’ (76 results), ‘icg intra arterial’ (61 results), ‘indocyanine green intra arterial’ (103 results), and to the best of our knowledge, this is the first reported description of this technique. There are similar experiments with intra-arterial ICG-staining but without the idea of marking the resection borders. Liu et al. performed a study on 11 pigs to assess the feasibility of real-time fluorescence angiography by intra-arterial ICG injection into mesenterial branches to identify obscure gastrointestinal bleeding areas [13]. A case report from Ono et al. presents an intraoperative localization of arteriovenous malformation of a 95-year old man’s jejunum with combined use of angiographic methods and indocyanine green injection (ICG) [14]. Ryu et al. described a colorectal cancer surgery performed in a patient using fluorescence angiography to determine the watershed area of the superior rectal artery after resecting the rectum from the anal side [15]. They injected ICG after resection to evaluate the blood flow before anastomosis and areas of potential ischemia. The idea here was quite similar; however, ICG fluorescence imaging was not used to identify the resection borders, probably due to severe technical restrictions. In comparison to this study we present that resection borders may be determined before resection based on ICG-perfusion.

In this feasibility study we showed that intraoperative exclusive coloring of the rectum including the mesorectum is possible. With an overlapping infrared-sensitive laparoscopy camera we can clearly show the resection border by identifying the end of ICG-fluorescence at the mesocolon (Figure 2(c,d)). With continuous perfusion via perfusion pump, we were able to establish a continuous sufficient perfusion up

to the perfusion area of A. rectalis superior via A. mesenterica inferior.

One limitation of this study is the use of laparotomy for puncturing the AMI. Another restriction is that we did not measure the time until no more fluorescence was detected after initial perfusion. Naturally there might be a ‘wash-out’ for the substance, but as we bypass the liver and excretion into bile by hepatocytes, which capture more than 95% of ICG within 15 min, we estimated extended fluorescence in the tissue perfused by AMI [11,16,17]. We could observe that one hour after perfusion there was no difference in subjective fluorescence intensity in the rectal tube.

Further studies must deal with some important questions. What happens during intraoperative bleeding and how coagulation of the tissue (i.e. of the mesorectum) interferes with the fluorescence image. Of course, ICG may contaminate the abdominal cavity so that fluorescence laparoscopy is no longer useful. Another question is whether the vascular anatomy of the human body and retrograde perfusion may prevent a sufficient ICG staining of the rectum. Also, prospective randomized trials should be performed to show if there is any difference in quality of resection according to MERCURY-Classification [4], dimension of resection and complications compared to current open or laparoscopic operation procedures.

Conclusion

ICG perfusion and overlapping real-time fluorescence laparoscopy may help surgeons to perform safer and better surgery by clearly identifying embryonal resection borders and organ perfusion. Visualizing resection borders based on ICG-perfusion before placing the first cut may be a new approach in oncological surgery. Further trials should verify the advantage of the fluorescence-guided surgical technique.

Declaration of interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- [1] Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986;1:1479–82.
- [2] E.V. DDG für H und MO. Rektumkarzinom - Leitlinie. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Ther hämatologischer und Onkol Erkrankungen 2016.

- [3] Heald RJ, Husband EM, Ryall RDH. The mesorectum in rectal cancer surgery – the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg.* 1982;69:613–6.
- [4] Hermanek P, Hohenberger W, Klimpfinger M, et al. The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18:335–41.
- [5] Grinnell RS. Lymphatic block with atypical and retrograde lymphatic metastasis and spread in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1966;163:272–80.
- [6] Ding J, Liao G, Xia Y, et al. Medial versus lateral approach in laparoscopic colorectal resection: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg.* 2013;37:863–72.
- [7] Keller DS, Ishizawa T, Cohen R, et al. Indocyanine green fluorescence imaging in colorectal surgery: overview, applications, and future directions. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2:757–66.
- [8] Diana M, Agnus V, Halvax P, et al. Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model. *Br J Surg.* 2015;102:e169–76.
- [9] Jafari MD, Wexner SD, Martz JE, et al. Perfusion assessment in laparoscopic left-sided/anterior resection (PILLAR II): a multi-institutional study. *J Am Coll Surg.* 2015;220:82–92.
- [10] Nishigori N, Koyama F, Nakagawa T, et al. Visualization of lymph/blood flow in laparoscopic colorectal cancer surgery by ICG fluorescence imaging (Lap-IGFI). *Ann Surg Oncol.* 2016;23:266–74.
- [11] Boni L, David G, Mangano A, et al. Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 2015;29:2046–55.
- [12] Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009;115:2491–504.
- [13] Liu Y-Y, Pop R, Diana M, et al. Real-time fluorescence angiography by intra-arterial indocyanine green injection to identify obscure gastrointestinal bleeding territory: proof of concept in the porcine model. *Surg Endosc.* 2016;30:2143–50.
- [14] Ono H, Kusano M, Kawamata F, et al. Intraoperative localization of arteriovenous malformation of a jejunum with combined use of angiographic methods and indocyanine green injection: Report of a new technique. *Int J Surg Case Rep.* 2016;29:137–40.
- [15] Ryu S, Yoshida M, Hironori O, et al. Intraoperative ICG fluorescence contrast imaging of the main artery watershed area in colorectal cancer surgery: report of a case. *Int J Surg Case Rep.* 2016;26:176–8.
- [16] Ishizawa T, Bandai Y, Ijichi M, et al. Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg.* 2010;97:1369–77.
- [17] Ishizawa T, Tamura S, Masuda K, et al. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery. *J Am Coll Surg.* 2009;208:e1–4.



OPEN Conditioning of microvascular venous flaps in rats

Christian Heiliger¹✉, Lucas M. Ritschl¹, Andreas M. Fichter¹, Lukas K. Postl², Anastasios Kanatas³, Klaus Dietrich Wolff¹ & Thomas Mücke¹

Venous-only perfusion flaps have not been used widely because of the associated high failure rate. Tissue conditioning offers a broad scope of techniques that can be applied pre-, peri-, or postoperatively to promote the adaptation of the affected tissue to any subsequent stress. This study aimed to assess the survival rates associated with a pure venous perfusion flap and investigate whether the timing of the vascular conditioning can affect free flap survival. Forty-four rats were included in the experiment. Group I underwent veno-arterial anastomoses with epigastric graft with pure venous perfusion without tissue conditioning. Groups II and III were pretreated for 7 or 14 days with ischemic conditioning. These groups were compared with a control group (group IV) of conventionally perfused flaps. After the initial surgery, all flaps were assessed clinically, photometrically, and by indocyanine green videoangiography. The flap success rates were 0% in group I, 49.97% ± 24.34% in group II, and 64.95% ± 20.36% in group III. The control group showed an overall survival of 89.3% ± 6.51%. With suitable conditioning, pure venous blood supply can provide adequate perfusion in the rat epigastric flap model. The timing of vascular conditioning appears to be critical for flap survival.

Advancements in free tissue transfer have made a marked difference in the field of reconstructive microsurgery. Free flaps are the best reconstructive options after major head and neck surgery. However, the usual microvascular tissue transfer is not possible in rare situations¹. Some of the challenges include recurrent diseases, a history of previous neck dissection, and previous radical or adjuvant radiotherapy to the neck. In some instances, surgery is the only available treatment modality, and the reduced availability or poor quality of neck vessels increased the complication rates^{2–5}. In these patients, the neck vessels could affect the chance of cure, especially if surgery resulted in functional impairment⁶. In the absence of suitable arteries, venous perfusion could be an alternative for soft tissue reconstruction. Even though venous vessels are often the limiting factors in clinical practice, arterialized venous “flow-through” flaps could offer additional reconstruction option. Secondary venous perfusion via the arterial vessels of the flap could be also conceivable in the context of rescue operations. In the case of multivessel supply, the appropriate use of venous connecting vessels could also expand the surgical options.

Furthermore, an understanding of the underlying physiological changes in conditioning could result in further improvements in free flap transfer. Arterialized venous “flow-through” flaps have been used for the coverage of small soft tissue defects of the finger; however, pure venous flaps are difficult to predict, and flap failure or partial flap necrosis often occurs^{7–12}. A purely venous perfusion approach has not shown satisfactory results in the past; as a result, various concepts have been described to improve the survival rate of venous flaps. These include surgical delay procedures^{8,13} or pre-arterialization of venous flaps^{14,15}. Surgical delay is the predecessor of modern preconditioning techniques. Clinically, arterialized venous flaps have been used^{7–11,16–21}; however, these have not yet been established for complex defect reconstruction^{22,23}.

This study aimed to perfuse a flap with venous blood through the artery similar to arterialized venous flaps^{8,9,19–21} and explore flap survival with soft conditioning. In this study, the efferent vein was retrogradely pre-arterialized, and the flap was preconditioned with an ischemic delay procedure^{8,13,24,25} to ensure sufficient blood circulation of the tissue graft with venous blood after tissue transplantation.

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine, Technical University of Munich, Klinikum Rechts Der Isar, Munich, Germany. ²Medical Faculty, Johannes Kepler University Linz, Linz, Austria. ³St James Institute of Oncology and Leeds Dental Institute, Leeds Teaching Hospitals, Leeds, UK. ✉email: heiliger.ch@gmail.com

Materials and methods

A total of 51 male Wistar rats (280–320 g; Fa. Charles River; Kißlegg, Germany) were used in this study. All procedures were conducted in strict accordance with the recommendations and guidance for the care and use of laboratory animals of the National Institutes of Health, which received full approval by the local Ethical Committee on Animal Experimentation (Regierung von Oberbayern, AZ55.2-1-54-2532-129-10) by Technical University. The study was carried out in compliance with the ARRIVE guideline.

Food and water were provided ad libitum. All surgical procedures were performed aseptically under intravenous general anesthesia composed of ketamine 100 mg/kg (Narketan[®], Fa. Vêtoquinol GmbH, Ravensburg, Germany) and xylazine 5 mg/kg (Rompun[®], Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) as described elsewhere²⁶. Every effort was made to minimize animal suffering.

Surgical technique. The epigastric flap was raised as a pedicled flap based on the epigastric pedicle from the deep inferior vascular system with a standardized dimension of 4 × 7 cm, as comprehensively described elsewhere^{27,28}. Surgery was performed with a microscope-type OPMI[®] Pentero[®] equipped with an integrated near-infrared videoangiography detection system and FLOW 800 tool (INFRARED 800, Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Germany) to subsequently analyze the fluorescence behavior over time and direction of blood flow after the anastomoses.

Catheterization of the femoral vein. After the preparation of the right femoral vessels, the femoral vein was catheterized by longitudinal venotomy distal to the inguinal ligament. The catheter was secured by temporary vessel clips distally to the venotomy. Owing to repeated catheterizations, the vessel clips were removed, and the venotomy was closed with interrupted sutures after each operation.

Veno-arterial anastomosis. Access to the epigastric vessels was obtained via a 3–4 cm long left inguinal incision. After preparation and isolation of the femoral vessels, the side branches were ligated, and the epigastric vessels were dissected 1–2 cm distal to the femoral root. In preparation for anastomosis, the femoral vein and artery were ligated distal to the epigastric vein and proximal to the epigastric artery, respectively. The epigastric artery, along with a short segment of the distal femoral artery, was anastomosed end-to-end with the distal portion of the femoral vein. The continuity of the femoral artery was reestablished by anastomosing the proximal and distal portions of the femoral artery (Figs. 1 and 2).

Experimental groups. All rats were randomized by a computer-generated list and subdivided into four groups ($n=11$ each), comprising three experimental groups (I–III) and one control group (IV). Following a strict protocol, a different technique was performed for each group (Table 1). Group I included rats with a veno-arterial anastomosis without preconditioning: the epigastric flap was raised, and a purely venous perfusion system was constructed. On the same day, the flap was sutured back into the epigastric defect (Fig. 1).

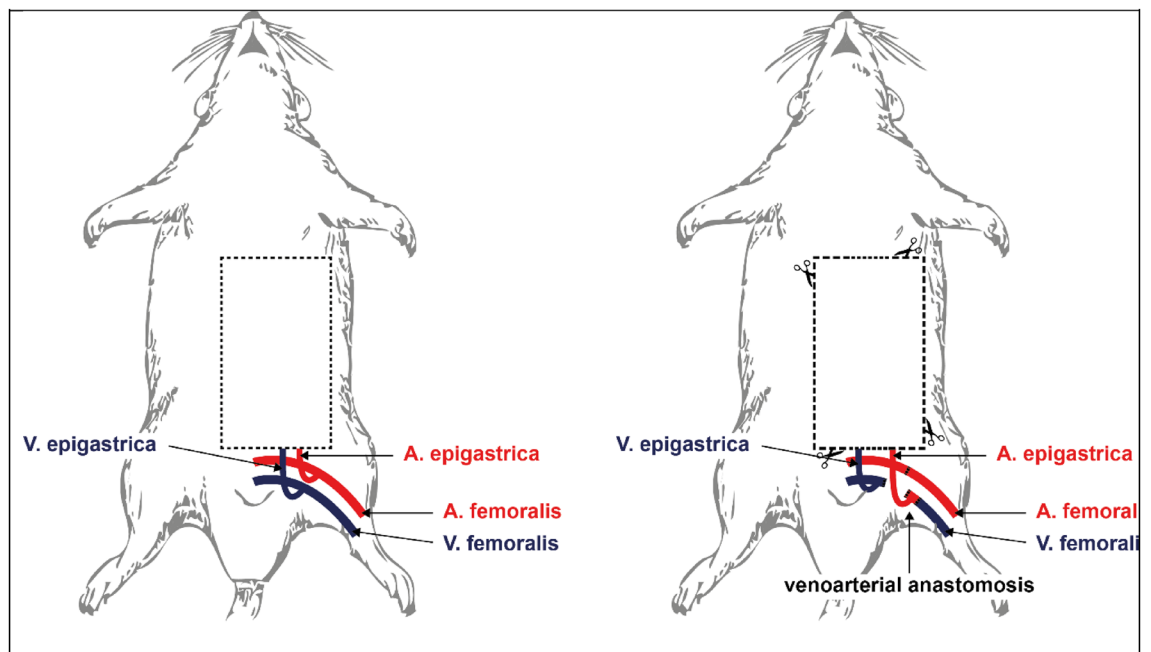


Figure 1. Schematic illustration of the experimental model. The femoral vein was ligated distal to the epigastric vein and the femoral artery proximal to the epigastric artery. The epigastric artery together with a distal part of the femoral artery was anastomosed with the distal femoral vein. An anastomosis of the proximal and distal part of the femoral artery was also performed.

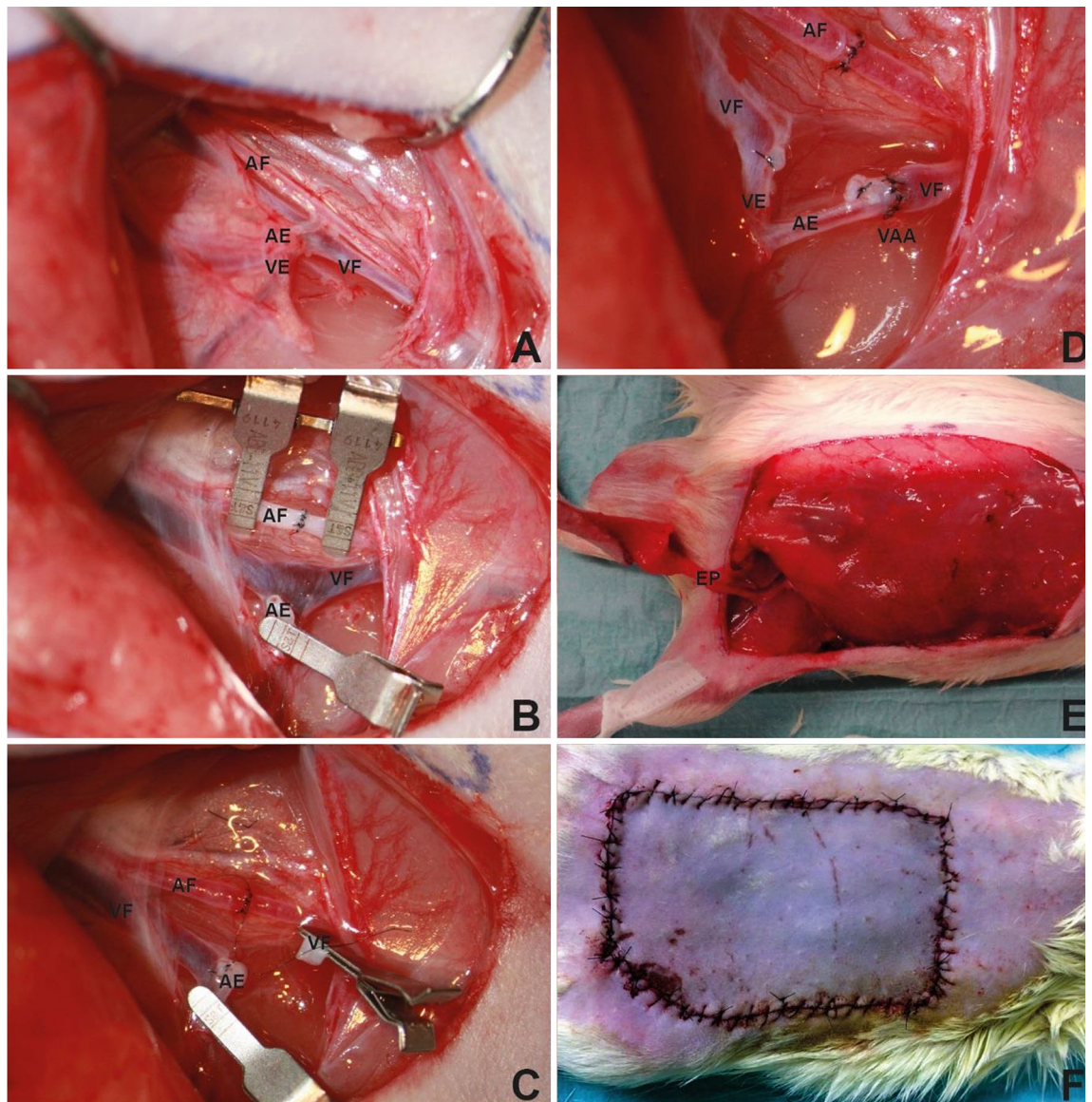


Figure 2. Clinical situation of the surgical procedure. (A) Femoral artery and vein with the epigastric branches. (B) Dissected epigastric vessels with its femoral origin and re-anastomosed femoral artery. (C) The re-perfused femoral artery, ligated branch of the proximal femoral vein, and first stitch in the distal femoral vein. (D) Anastomosis between the distal femoral vein and the epigastric artery. The distal femoral vein shows an arterial red color that can be explained by the retrograde arterial inflow from the mammarian artery. (E) Raised flap that is now perfused only by the epigastric vessels. (F) Flap sutured back into the wound bed in group III (+ 14 d). The flap appears slightly livid compared with the surrounding tissue. AF—arteria femoralis; AE—arteria epigastrica; EP—epigastric pedicle; VF—vena femoralis; VE—vena epigastrica; VAA—veno-arterial anastomosis.

In group II, a veno-arterial anastomosis was constructed, but the flap was raised and set back into the epigastric defect 7 days later to realize preconditioning. In group III, a similar venous-only perfusion was constructed, but the flap was raised and set back after an interval of 14 days for a longer preconditioning period.

In the control group (IV), a standard arterial epigastric flap (based on the epigastric pedicle) was raised, the epigastric artery with its femoral origin was cut and re-anastomosed, and the flap was directly sutured back into the epigastric defect.

All flaps were assessed 7 days after the flap was raised (Table 1).

Indocyanine green (ICG) videoangiography. In addition to observing flap color, capillary refill, blood loss, and palpation of the anastomosis, ICG videoangiography was performed to describe fluorescence behavior and blood flow direction in the flaps and critically assess the patency of the microvascular anastomoses. Accordingly, we injected ICG (ICG-PULSION, Pulsion Medical Systems AG; Munich, Germany) intravenously and used the integrated fluorescence imaging device of the microscope (OPMI[®] Pentero[®], Carl Zeiss AG; Oberkochen,

Group #	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21
I (+0 d)	Veno-arterial anastomosis and flap raising	Euthanasia and flap assessment		
II (+7 d)	Veno-arterial anastomosis	Flap raising	Euthanasia and flap assessment	
III (+14 d)	Veno-arterial anastomosis		Flap raising	Euthanasia and flap assessment
IV-controlgroup (+0 d)	Arterial anastomosis and flap raising	Euthanasia and flap assessment		

Table 1. Experimental protocol for the different groups ($n = 11$ rats each group). Groups I–III included rats with a veno-arterial anastomosis. Group I included rats with a veno-arterial anastomosis without preconditioning: the epigastric flap was raised, and a purely venous perfusion system was constructed. On the same day, the flap was sutured back into the epigastric defect (Fig. 1). In group II, a veno-arterial anastomosis was constructed, but the flap was raised and set back into the epigastric defect 7 days later for preconditioning. In group III, a similar venous-only perfusion was constructed, but the flap was raised and set back after an interval of 14 days for a longer preconditioning period. In the control group (IV), a standard arterial epigastric flap (based on the epigastric pedicle) was raised, the epigastric artery with its femoral origin was cut and re-anastomosed, and the flap was directly sutured back into the epigastric defect. All flaps were assessed 7 days after flap raising.

Germany). The imaging device was centered perpendicularly over the surgical field with a standardized distance of 30 cm. To assess the anastomosis and the flap, ICG videoangiography was performed for each experiment after each surgical step (veno-arterial anastomosis, flap raising, and flap assessment). First, an angiography of the flap, followed by another angiography of the anastomosis, was performed. The ICG (0.3 mg/kg body weight, 25 mg dissolved in 5 mL of sterile water) was injected intravenously as a bolus into the central venous catheter. The fluorescence signal was visualized on the video screen in real time (25 images/second) and recorded immediately after dye injection for 80 s, as described previously²⁹. The mean ICG intensity of the flap was analyzed, as described previously²⁹.

Morphometric angiographic analysis of the vascular network was performed using a method described by Takeshita et al.⁴¹. A composite of 5 mm² grids was placed over the flap area. The total number of grid intersections and intersections crossed by an ICG-stained vessel were counted individually by an observer blinded to the treatment regimen. An ICG vessel score was calculated for each ICG angiography, as the ratio of grid intersections crossed by vessels divided by the total number of grid intersections in the flap²⁹. Furthermore, the time from injection to the first ICG signal in the flap was recorded.

Planimetric measurement of necrotic areas. Seven days after flap raising and setting it back, all rats were put under anesthesia, and flap healing was documented using a digital SLR camera (Nikon Coolpix 8700, Nikon Corp., Chiyoda, Tokyo, Japan) mounted perpendicular to the flap with a tripod. Vital and necrotic areas in the images were analyzed. Thus, the total flap area and necrotic areas were manually circumscribed using a graphic tablet, and the cross-sectional area was calculated using NIH Image Software (Image J 1.41; National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA)³⁰.

Statistics. All observations were independently evaluated by two investigators blinded to the experimental groups. For basic statistical analysis, Prism 7 for Mac OS X Version 7.0a (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used. The IBM SPSS Statistics for Windows version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the multivariate analysis. The necrosis rate and mean ICG intensity of the flap were assessed using ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) to determine significant between-group differences. Mean values and standard deviation (SD) were used to describe the flooding speed of the ICG signal in the flap. The time from ICG injection to its detection in the flap and vascular network was assessed using ordinary one-way ANOVA to determine significant between-group differences. Tukey's multiple comparison testing was used to account for the problem of multiple testing. Differences were considered statistically significant for a two-sided p value of < 0.05 . All data are presented as mean \pm SD.

Results

A total of 51 rats underwent surgery. Seven rats could not be included because of autodigestion or adverse events of anesthesia. The corresponding experimental series was conducted with 11 animals per group. In total, 44 rats survived the postoperative period and tolerated the anesthesia and operative procedures. In the postoperative monitoring of the flaps, a more livid color of the venously perfused epigastric flaps was observed in groups II and III, especially in comparison with the normal color of the non-transplanted skin (Fig. 2F). Flap edema was not observed in groups II and III.

Flap survival. In the comparison of the different groups, obvious and significant differences were found in the resulting necrosis rates (Fig. 3). The control group had a vitality rate of $89.3\% \pm 6.51\%$, group I had 0%, group II had $49.97\% \pm 24.34\%$, and group III had $64.95\% \pm 20.36\%$. A significant difference was found between the



Figure 3. Flap survival. The mean survival rate in the control group was $89.3\% \pm 6.51\%$, total flap necrosis was found in group I, the mean survival rate in group II was $49.97\% \pm 24.34\%$, and that in group III was $64.95\% \pm 20.36\%$. In all groups, a necrosis pattern developed from mediocranial to laterocaudal, which corresponds with the findings of the perfusion pattern in ICG videoangiography (Fig. 4I).

control group and groups I ($p < 0.01$), II ($p < 0.01$), and III ($p < 0.01$) and between groups I and II ($p < 0.01$). Significant differences were also found between groups I and III ($p < 0.01$) and between groups II and III ($p = 0.034$).

ICG videoangiography. In all rats with veno-arterial anastomosis, ICG videoangiography revealed a reversed blood flow after the anastomosis, with blood supply derived from the internal mammary artery. In detail, the newly established blood flow ran anterogradely from the internal mammary artery to the anastomosis in the groin region and subsequently arterialized the distal femoral vein, and this resulted in vein dilation. Flap raising and corresponding transection of all perforators from the internal mammary and lateral thoracic artery resulted in a pure venous supply of the epigastric flap because the retrograde arterial perfusion of the femoral vein could no longer be ascertained (Fig. 4G). In groups II and III (7-/14-day interval), a slight ICG fluorescence intensity distal to the anastomosis was registered, whereas in group I (raising and setting back immediately after the anastomosis), fluorescence intensity could barely be detected (Fig. 4D/E/F). The ICG videoangiography of the flap perfusion immediately after flap harvesting showed a much stronger fluorescence intensity in groups II and III than in group I, where no recognizable ICG fluorescence was determined (Fig. 4A/B/C). The ICG fluorescence spread from laterocaudal to mediocranial, whereby the craniomedial parts were less perfused.

Groups II and III showed a more pronounced ICG perfusion of the flaps at the end of the experiment compared with flap perfusion immediately after flap raising (Fig. 4B/I). In the examination of the vessels, the perfusion of the venous anastomosis improved compared with the state just after flap raising (Fig. 4E/F/H).

After the experiment, the venous perfusion through the anastomosis in groups II and III 7 days after flap raising clearly increased compared with that directly after raising, and no retrograde perfusion was found (Fig. 4E/H/G). The ICG fluorescence still spread from laterocaudal to mediocranial, whereby the craniomedial parts were also still less perfused and showed corresponding areas of necrosis. However, this observation could not be analyzed statistically because no corresponding objective parameters were chosen for this purpose.

Regarding the mean intensity analysis in group I, no flap perfusion was detected as all cases had complete necroses clinically. A significant difference was detected in the mean intensity immediately after flap raising ($p < 0.01$), but not after the reevaluation of the epigastric flaps after 7 days between groups II and III (156.45 AU vs. 173.65 AU; $p = 0.089$). However, in the final angiography, the ICG signal in the flap was detected faster in group III than in group II (8.33 ± 1.21 s vs. 15.50 ± 3.45 s; $p < 0.01$). In addition, the vascular network, described as the ratio of grid intersections crossed by vessels divided by the total number of grid intersections in the flap, in group III was generally more precisely visible than the level in group II ($0.50 \text{ AU} \pm 0.08$ versus $0.32 \text{ AU} \pm 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 4).

Discussion

Venous flaps differ from conventional microvascular free flaps (nutrition via an arterial inflow). Normally, venous flaps are perfused completely by the venous system, including a venous inflow and outflow. In the present model, the inflow was maintained, but the arterial side of the vessels was replaced by the inflow of venous blood. In this rat model, oversized flaps were raised to evaluate the differences between each experimental group. The timing of vascular conditioning is an important step in the overall survival of these flaps. Additionally, the duration of flap conditioning appears to be a crucial factor for flap survival. Fluorescence angiography immediately after flap raising showed significantly better ICG intensities in group III than in group II. Although there was no higher ICG intensity between-group II and III at the end of the trial, clinically, significantly better flap survival with longer conditioning was observed group III than in group II. The flow-in time of ICG in the flap was faster in group III than in group II, as well as a higher density of the capillary network, which also appears to be a positive effect of longer conditioning.

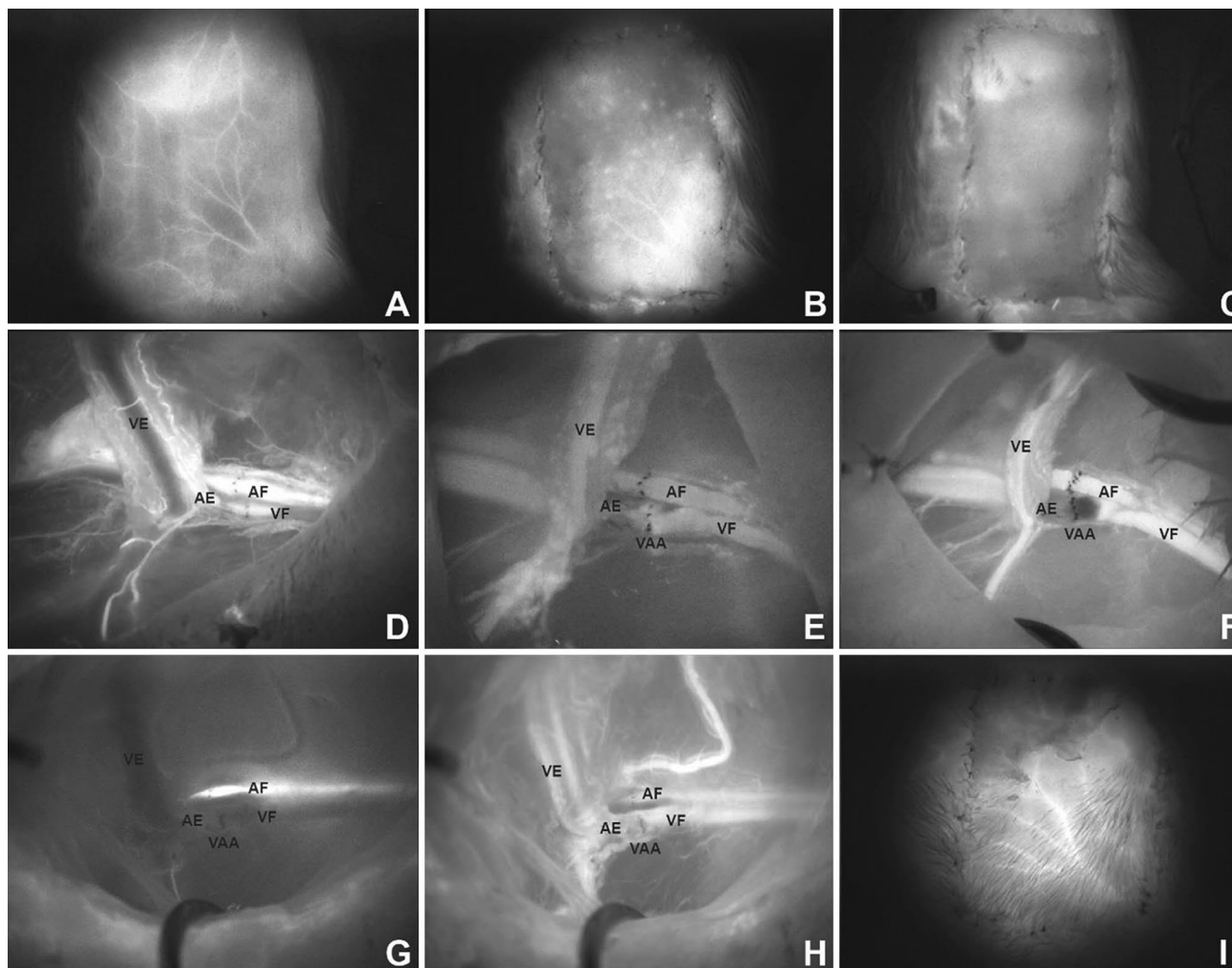


Figure 4. Results of ICG videoangiography. Decreased perfusion after flap raising (B, venous phase at 60 s) compared with flap perfusion before the raising [(A) arterial phase at 15 s] in groups II and III. Note the perfusion pattern after flap raising (B); no ICG fluorescence in the flap immediately after flap raising in group I [(C), venous phase at 75 s]; venous flow-through the anastomosis in group I was not seen [(F) venous phase at 65 s]; venous perfusion through the anastomosis in groups II and III 7 days after flap raising [(H) venous phase at 40 s] clearly increased compared with that directly after raising [(E) venous phase at 57 s]; no retrograde perfusion at the end of the experiment [(G) arterial phase at 15 s] compared with retrograde arterialized femoral vein through mammarian artery directly after microanastomosis [(D) arterial phase at 17 s]; increased ICG fluorescence at the end of the experiment [(I), venous phase at 45 s] compared with the perfusion pattern directly after flap raising [(B) venous phase at 60 s] in groups II and III. AF—arteria femoralis; AE—arteria epigastrica; VF—vena femoralis; VE—vena epigastrica; VAA—veno-arterial anastomosis.

The effect can be postulated due to an initially better perfusion of the flaps, and a longer conditioning is reasonable. In this study, soft tissue flaps with pure venous blood supply can be sufficiently perfused. Previously, venous tissue flaps were mainly applied in finger or toe reconstruction^{7,20,21}. These defects are usually relatively small, and venous flaps are selected for the reconstruction of functionally important regions in which split-skin or whole-skin grafts could cause too much scarring and severely impair functional outcomes^{7,20,21}. Some authors refer to venous flaps as “venous skin grafts”³¹ because the epithelial part of the flap mostly undergoes necrosis. In our experiment, we could not confirm this observation because the epithelium was not necrotic in the well perfused area (Figs. 3 and 4). Yoshimura et al.³¹ anastomosed distal veins of the flap with arteries to increase the oxygenation within the flap, which was successful in 12 of 13 cases; however, all flaps had partial necroses. Thatte et al. described purely venous perfused flaps, which led to survival rates of 0–30%³², whereas arterialized venous flaps showed survival rates of approximately 75%, comparable to group III in this study^{33,34}. Although arterialized venous flaps have shown the best outcomes to date, the present technique showed similar results, containing a new aspect in the use of venous tissue grafts when no arterial connection is present. This effect could represent a new possibility for the use of venous soft tissue flaps. The conditioning of the vascular system and flap could be performed in a short preparatory surgery before the actual reconstruction. This advantageous conditioning step could take place in the first operative step because many clinics perform a secondary reconstruction (two-staged approach) after appropriate tumor ablation, when the histological examination of a resected tumor

is performed^{35,36}. The qualitative results of intraoperative ICG videoangiography in the present study showed that the immediate transposition of the flap's vascular supply into a venous system without preconditioning did not lead to sufficient flap perfusion. Generally, adequate flap perfusion and continuous blood flow-through the anastomoses were observed in the fluorescence angiographic examination in the two-staged procedures of groups II and III. Further, increased vascularization in both preconditioned flap groups was seen in ICG videoangiography, represented by a higher density of the vascular network. Considering the clinical results as indicated by the survival rates, the circulation within the flap was assumed to adapt to the blood pressure of the venous system on the arterial side of the flap. Interestingly, no outflow problems occurred, which may be caused by the lower venous inflow and may serve as a starting point for further investigations. Moreover, the vascular network was angiographically well perfused after establishing blood flow over 14 days (group III) compared with the vascularization after 7 days (group II) and immediately after the creation of the veno-arterial anastomosis (group I). The present mechanism is suggestive of "hemodynamic remodeling" because of the perfusion change and adaptation over time. In contrast to arterialized venous flaps such as those described in the literature, this remodeling type turns the high-pressure arterial perfusion into a low-pressure one, which appears to be more physiological. The new veno-arterial blood flow is constant and unidirectional physiologically³⁷. These effects show the physiological remodeling of the arterial vasculature adopted to the venous constant and low-oxygenated blood flow³⁸. Similar to other attempts^{8,13,25,39,40}, this study showed that there is much potential in the conditioning of transplants, although the physiological basis is still not understood comprehensively. Whether the ischemic conditioning of the transplant or the arterial retrograde vascular conditioning is responsible for the survival rate should be investigated.

Furthermore, whether retrograde perfusion in the sense of a veno-venous flap with appropriate conditioning leads to equal, better, or worse flap survival should be explored. Thus, whether nutrient and oxygen supply are secondary in doubt and the vascular system and corresponding hemodynamic remodeling are not primarily decisive for flap survival could be further evaluated. The extent to which this experimental form of free flaps could represent a real alternative in clinical use must be investigated in follow-up experiments, especially since venous connecting vessels are often lacking in critical conditions.

Conclusion

In our rat epigastric flap model, free flaps with pure venous blood supply can be sufficiently perfused. The timing of vascular conditioning proved to be an important step in the overall survival of these flaps. Additionally, the duration of flap conditioning appears to be a crucial factor for flap survival. Whether ischemic conditioning of the transplant or arterial retrograde vascular conditioning is responsible for the survival rate remains to be investigated.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 17 August 2021; Accepted: 12 January 2023

Published online: 19 January 2023

References

- McLean, D. H. & Buncke, H. J. Jr. Autotransplant of omentum to a large scalp defect, with microsurgical revascularization. *Plast. Reconstr. Surg.* **49**(3), 268–274 (1972).
- Mücke, T. *et al.* Influence of irradiation and oncologic surgery on head and neck microsurgical reconstructions. *Oral Oncol.* **48**(4), 367–371 (2012).
- Klug, C. *et al.* Influence of previous radiotherapy on free tissue transfer in the head and neck region: Evaluation of 455 cases. *Laryngoscope* **116**(7), 1162–1167 (2006).
- Schultze-Mosgau, S. *et al.* Vascularization in the transition area between free grafted soft tissues and pre-irradiated graft bed tissues following preoperative radiotherapy in the head and neck region. *Head Neck* **24**(1), 42–51 (2002).
- Urken, M. L. *et al.* Microvascular free flaps in head and neck reconstruction: Report of 200 cases and review of complications. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **120**(6), 633–640 (1994).
- Mücke, T. *et al.* Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer. *Oral Oncol.* **45**(8), 687–691 (2009).
- Iwasawa, M. *et al.* Reconstruction of fingertip deformities of the thumb using a venous flap. *Ann. Plast. Surg.* **28**(2), 187–189 (1992).
- Cho, B. C. *et al.* Clinical applications of the delayed arterialized venous flap. *Ann. Plast. Surg.* **39**(2), 145–157 (1997).
- Chen, C. L. *et al.* Arterialized tendocutaneous venous flap for dorsal finger reconstruction. *Microsurgery* **15**(12), 886–890 (1994).
- Tsai, T. M. *et al.* Venous flaps in digital revascularization and replantation. *J. Reconstr. Microsurg.* **3**(2), 113–119 (1987).
- Yilmaz, M. *et al.* Free arterialized venous forearm flap. *Ann. Plast. Surg.* **34**(1), 88–91 (1995).
- Kayalar, M. *et al.* Clinical applications of free arterialized venous flaps. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. JPRAS* **67**(11), 1548–1556 (2014).
- Yan, H. *et al.* Improvement of pre-arterialized venous flap survival with delay procedure in rats. *J. Reconstr. Microsurg.* **26**(3), 193–200 (2010).
- Wungcharoen, B., Santidhananon, Y. & Chongchet, V. Pre-arterialisation of an arterialised venous flap: Clinical cases. *Br. J. Plast. Surg.* **54**(2), 112–116 (2001).
- Fukui, A. *et al.* A method for prevention of arterialized venous flap necrosis. *J. Reconstr. Microsurg.* **14**(1), 67–74 (1998).
- Chavoïn, J. P. *et al.* Island flaps with an exclusively venous pedicle. A report of eleven cases and a preliminary haemodynamic study. *Br. J. Plast. Surg.* **40**(2), 149–154 (1987).
- Nakayama, Y., Soeda, S. & Kasai, Y. Flaps nourished by arterial inflow through the venous system: An experimental investigation. *Plast. Reconstr. Surg.* **67**(3), 328–334 (1981).
- Wolff, K. D. *et al.* Isotope perfusion and infrared thermography of arterialised, venous flow-through and pedicled venous flaps. *Br. J. Plast. Surg.* **48**(2), 61–70 (1995).
- Deune, E. G. *et al.* Arterialized venous flow-through flap for simultaneous reconstruction of a radial artery defect and palmar forearm soft-tissue loss from sarcoma resection. *J. Reconstr. Microsurg.* **21**(2), 85–91 (2005).

20. Kayıkçıoğlu, A. *et al.* Arterialized venous dorsal digital island flap for fingertip reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* **102**(7), 2368–2372 (1998).
21. Woo, S. H. *et al.* A retrospective analysis of 154 arterialized venous flaps for hand reconstruction: An 11-years experience. *Plast. Reconstr. Surg.* **119**(6), 1823–1838 (2007).
22. Safak, T. & Akyürek, M. Cephalic vein-pedicled arterialized anteromedial arm venous flap for head and neck reconstruction. *Ann. Plast. Surg.* **47**(4), 446–449 (2001).
23. Klein, C. Experiences with an arterialized venous flap for intraoral defect reconstruction. *Zentralbl. Chir.* **125**(1), 51–55 (2000).
24. Seyhan, T. *et al.* Comparison of two different vascular delay methods in a rat cranial epigastric perforator flap model. *Ann. Plast. Surg.* **64**(1), 89–92 (2010).
25. Mounsey, R. A., Pang, C. Y. & Forrest, C. Forrester, C. Forrester, preconditioning: A new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol-head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **107**(4), 549–552 (1992).
26. Taylor, G. I. Nerve grafting with simultaneous microvascular reconstruction. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **133**(133), 56–70 (1978).
27. Taylor, G. I. Reconstruction of the mandible with free composite iliac bone grafts. *Ann. Plast. Surg.* **9**(5), 361–376 (1982).
28. Bootz, F. & Preyer, S. Microvascular tissue transfer for plastic reconstruction of the surface of the head and neck region. *Laryngorhinootologie* **73**(10), 538–542 (1994).
29. Mücke, T. *et al.* Objective qualitative and quantitative assessment of blood flow with near-infrared angiography in microvascular anastomoses in the rat model. *Microsurgery* **33**(4), 287–296 (2013).
30. Bui, D. T. *et al.* Free flap reexploration: Indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* **119**(7), 2092–2100 (2007).
31. Yoshimura, M. *et al.* The venous skin graft method for repairing skin defects of the fingers. *Plast. Reconstr. Surg.* **79**(2), 243–250 (1987).
32. Thatte, M. R. & Thatte, R. L. Venous flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* **91**(4), 747–751 (1993).
33. Yilmaz, M. *et al.* Effects of the number of pedicles on perfusion and survival of venous flaps: An experimental study in rabbits. *Ann. Plast. Surg.* **39**(3), 278–286 (1997).
34. Xiu, Z. F. & Chen, Z. J. The microcirculation and survival of experimental flow-through venous flaps. *Br. J. Plast. Surg.* **49**(1), 41–45 (1996).
35. Kansy, K. *et al.* Microsurgical reconstruction of the head and neck—Current concepts of maxillofacial surgery in Europe. *J. Cranio-maxillo-fac. Surg. Off. Pub. Eur. Assoc. Cranio-maxillo-fac. Surg.* **42**(8), 1610–1613 (2014).
36. Mücke, T. *et al.* Microsurgical reconstruction of the head and neck—current practice of maxillofacial units in Germany, Austria, and Switzerland. *J. Cranio-maxillo-fac. Surg. Off. Pub. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Fac. Surg.* **39**(6), 449–452 (2011).
37. Suzuki, Y., Suzuki, K. & Ishikawa, K. Direct monitoring of the microcirculation in experimental venous flaps with afferent arteriovenous fistulas. *Br. J. Plast. Surg.* **47**(8), 554–559 (1994).
38. Yan, H. *et al.* The effect of hemodynamic remodeling on the survival of arterialized venous flaps. *PLoS ONE* **8**(11), e79608 (2013).
39. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**(5), 1124–1136 (1986).
40. Lee, L. N. *et al.* Intraoperative laser-assisted indocyanine green imaging for objective measurement of the vascular delay technique in locoregional head and neck flaps. *JAMA Facial Plast. Surg.* **16**(5), 343–347 (2014).
41. Takeshita, S. *et al.* Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc. Res.* **35**(3), 547–552 (1997).

Acknowledgements

The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review.

Author contributions

All authors did the experiments and wrote the paper.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

5. Zusammenfassung der Veröffentlichungen

Intraarterial indocyanine green (ICG) fluorescence augmentation by marking embryonal resection areas in colorectal surgery: a feasibility study in a porcine model³³

Ziel: In dieser Pilotstudie am Schwein wurde untersucht, ob es möglich ist, die embryonalen Resektionsschichten bei der totalen mesorektalen Exzision von Rektumkarzinomen mit Hilfe einer intraarteriellen Indocyaningrün-Färbung sichtbar zu machen.

Material und Methoden: Es wurde ICG in die AMI von vier Schweinen injiziert, um zu sehen, ob der Wasserscheidebereich der arteriellen Versorgungszone durch Fluoreszenzbildgebung ausreichend sichtbar gemacht werden kann, um den richtigen Dissektionsbereich entlang der Fascia parietalis vor und während der Resektion zu markieren.

Ergebnisse: Wir beobachteten ein Fluoreszenzsignal in allen versorgten Bereichen der AMI, aber nicht in anderen Teilen der Bauchhöhle oder anderen Organen. Außerdem zeigte das Mesorektum eine scharfe Grenze zwischen gefärbtem und nicht gefärbtem Gewebe.

Schlussfolgerung: In dieser Studie zeigen wir, dass die Resektionsgrenzen vor der Resektion anhand der ICG-Perfusion bestimmt werden können. Außerdem konnten wir zeigen, dass intraoperativ eine ausschließliche Färbung des Rektums mit Mesorektum möglich ist. Die Visualisierung der Resektionsgrenzen auf Basis der ICG-Perfusion vor der Festlegung des ersten Schnittes könnte ein neuer Ansatz in der onkologischen Chirurgie sein.

Studentischer Beitrag: Idee, Planung und Durchführung der Experimente. Verfassen der Publikation.

Conditioning of microvascular venous flaps in rats¹⁰³

Hintergrund: Rein venöse Perfusionslappen werden aufgrund der hohen Ausfallrate nicht häufig verwendet. Die Gewebekonditionierung bietet ein breites Spektrum an Techniken, die prä-, peri- oder postoperativ angewendet werden können, um die Anpassung des betroffenen Gewebes an nachfolgende Belastungen zu fördern. Ziel dieser Studie war es, die Überlebensraten im Zusammenhang mit einem rein venösen Perfusionslappen zu bewerten und zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Gefäßkonditionierung das Überleben des freien Lappens beeinflussen kann.

Material und Methoden: Vierundvierzig Ratten wurden in den Versuch einbezogen. In Gruppe I wurden venös-arterielle Anastomosen mit epigastrischen Transplantaten mit rein venöser Perfusion ohne Gewebekonditionierung durchgeführt. Die Gruppen II und III wurden 7 bzw. 14 Tage lang mit einer ischämischen Konditionierung vorbehandelt. Diese Gruppen wurden mit einer Kontrollgruppe (Gruppe IV) aus konventionell perfundierten Lappen verglichen. Nach der ersten Operation wurden alle Lappen klinisch, photometrisch und mittels Indocyaningrün-Videoangiographie untersucht.

Ergebnisse: Die Erfolgsraten der Lappen waren 0% in Gruppe I, $49,97\% \pm 24,34\%$ in Gruppe II und $64,95\% \pm 20,36\%$ in Gruppe III. Die Kontrollgruppe wies eine Gesamtüberlebensrate von $89,3\% \pm 6,51\%$ auf.

Schlussfolgerung: Bei geeigneter Konditionierung kann die rein venöse Blutversorgung eine angemessene Perfusion im epigastrischen Lappenmodell der Ratte gewährleisten. Der Zeitpunkt der Gefäßkonditionierung scheint für das Überleben des Lappens entscheidend zu sein.

Beitrag der Studenten: Idee, Planung und Durchführung der Experimente. Verfassen der Publikation.

6. Genehmigung des Herausgebers zur Vervielfältigung der enthaltenen Artikel

Die Artikel sind Open-Access-Veröffentlichungen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Saito, H.; Ishikawa, T.; Tanabe, J.; Kobayashi, S.; Moroi, J. Bedside Assessment of Regional Cerebral Perfusion Using Near-Infrared Spectroscopy and Indocyanine Green in Patients with Atherosclerotic Occlusive Disease. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19668-5>.
- (2) Said, S. M.; Marey, G.; Hiremath, G. Intraoperative Fluorescence with Indocyanine Green in Congenital Cardiac Surgery: Potential Applications of a Novel Technology. *JTCVS Techniques* **2021**, *8* (August), 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.xjtc.2021.02.026>.
- (3) P, C.; M, F. The Retinal Circulation Time. *Am J Ophthalmol* **1958**, *1*, Part 2 (46), 8–10.
- (4) HR, N.; DL, A. A Method of Photographing Fluorescence in Circulating Blood in the Human Retina. *Circulation* **1961**, *24*, 82–86.
- (5) Yannuzzi, L. A. Indocyanine Green Angiography: A Perspective on Use in the Clinical Setting. *American Journal of Ophthalmology* **2011**, *151* (5), 745-751.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.01.043>.
- (6) Zelken, J. A.; Tufaro, A. P. Current Trends and Emerging Future of Indocyanine Green Usage in Surgery and Oncology: An Update. *Annals of Surgical Oncology* **2015**, *22*, 1271–1283. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4743-5>.
- (7) Egloff-Juras, C.; Bezdetnaya, L.; Dolivet, G.; Lassalle, H. P. NIR Fluorescence-Guided Tumor Surgery: New Strategies for the Use of Indocyanine Green. *International Journal of Nanomedicine* **2019**, *14*, 7823–7838. <https://doi.org/10.2147/IJN.S207486>.
- (8) Alander, J. T.; Kaartinen, I.; Laakso, A.; Pätilä, T.; Spillmann, T.; Tuchin, V. V.; Venermo, M.; Välisuo, P. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *International Journal of Biomedical Imaging* **2012**, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/940585>.
- (9) Cosco, E. D.; Lim, I.; Sletten, E. M. Photophysical Properties of Indocyanine Green in the Shortwave Infrared Region. *ChemPhotoChem* **2021**, *5* (8), 727–734. <https://doi.org/10.1002/cptc.202100045>.
- (10) Li, D. H.; Smith, B. D. Deuterated Indocyanine Green (ICG) with Extended Aqueous Storage Shelf-Life: Chemical and Clinical Implications. *Chemistry - A European Journal* **2021**, *27* (58), 14535–14542. <https://doi.org/10.1002/chem.202102816>.
- (11) Desmettre, T.; Devoisselle, J. M.; Mordon, S. Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Survey of Ophthalmology* **2000**, *45* (1), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(00\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00123-5).
- (12) Reinhart, M. B.; Huntington, C. R.; Blair, L. J.; Heniford, B. T.; Augenstein, V. A. Indocyanine Green :Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surgical Innovation* **2016**, *23* (2), 166–175. <https://doi.org/10.1177/1553350615604053>.
- (13) Hong, G.; Lee, J. C.; Robinson, J. T.; Raaz, U.; Xie, L.; Huang, N. F.; Cooke, J. P.; Dai, H. Multifunctional in Vivo Vascular Imaging Using Near-Infrared II Fluorescence. *Nature Medicine* **2012**, *18* (12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1038/nm.2995>.
- (14) Byrd, B. K.; Marois, M.; Tichauer, K. M.; Wirth, D. J.; Hong, J.; Leonor, J. P.; Elliott, J. T.; Paulsen, K. D.; Davis, S. C. First Experience Imaging Short-Wave Infrared Fluorescence in a Large Animal: Indocyanine Green Angiography of a Pig Brain. *Journal of Biomedical Optics* **2019**, *24* (08), 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.24.8.080501>.
- (15) Efficacy of different doses of dye-assisted internal limiting membrane peeling in idiopathic macular hole: a systematic review and network meta-analysis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33392941/> (accessed 2023-02-16).
- (16) Indocyanine green angiography in chorioretinal diseases: indications and interpretation: an evidence-based update - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511340/>

- (accessed 2023-02-16).
- (17) Woitzik, J.; Horn, P.; Vajkoczy, P.; Schmiedek, P. Intraoperative Control of Extracranial-Intracranial Bypass Patency by near-Infrared Indocyanine Green Videoangiography. *Journal of Neurosurgery* **2005**, *102* (4), 692–698. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.102.4.0692>.
 - (18) Ewelt, C.; Nemes, A.; Senner, V.; Wölfer, J.; Brokinkel, B.; Stummer, W.; Holling, M. Fluorescence in Neurosurgery: Its Diagnostic and Therapeutic Use. Review of the Literature. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, *148*, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.002>.
 - (19) Burnier, P.; Niddam, J.; Bosc, R.; Hersant, B.; Meningaud, J. P. Indocyanine Green Applications in Plastic Surgery: A Review of the Literature. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* **2017**, *70* (6), 814–827. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2017.01.020>.
 - (20) Mok, C. W.; Tan, S. M.; Zheng, Q.; Shi, L. Network Meta-Analysis of Novel and Conventional Sentinel Lymph Node Biopsy Techniques in Breast Cancer. *BJS open* **2019**, *3* (4), 445–452. <https://doi.org/10.1002/bjs5.50157>.
 - (21) Sakurai, T.; Endo, M.; Shimizu, K.; Yoshimizu, N.; Nakajima, K.; Nosaka, K.; Dai, Y.; Iwao, A.; Jinnai, Y. Axillary Reverse Mapping Using Fluorescence Imaging Is Useful for Identifying the Risk Group of Postoperative Lymphedema in Breast Cancer Patients Undergoing Sentinel Node Biopsies. *Journal of Surgical Oncology* **2014**, *109* (6), 612–615. <https://doi.org/10.1002/jso.23528>.
 - (22) Muhanna, N.; Chan, H. H. L.; Douglas, C. M.; Daly, M. J.; Jaidka, A.; Eu, D.; Bernstein, J.; Townson, J. L.; Irish, J. C. Sentinel Lymph Node Mapping Using ICG Fluorescence and Cone Beam CT - a Feasibility Study in a Rabbit Model of Oral Cancer. *BMC Medical Imaging* **2020**, *20* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12880-020-00507-x>.
 - (23) Yokoyama, J.; Ohba, S.; Fujimaki, M.; Kojima, M.; Suzuki, M.; Ikeda, K. Significant Improvement in Superselective Intra-Arterial Chemotherapy for Advanced Paranasal Sinus Cancer by Using Indocyanine Green Fluorescence. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **2014**, *271* (10), 2795–2801. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2846-9>.
 - (24) Shimada, Y.; Okumura, T.; Nagata, T.; Sawada, S.; Matsui, K.; Hori, R.; Yoshioka, I.; Yoshida, T.; Osada, R.; Tsukada, K. Usefulness of Blood Supply Visualization by Indocyanine Green Fluorescence for Reconstruction during Esophagectomy. *Esophagus* **2011**, *8* (4), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s10388-011-0291-7>.
 - (25) Chen, C. L.; Chiu, H. Y.; Lee, J. W.; Yang, J. T. Arterialized Tendocutaneous Venous Flap for Dorsal Finger Reconstruction. *Microsurgery* **1994**, *15* (12), 886–890.
 - (26) Ishizawa, T.; Bandai, Y.; Ijichi, M.; Kaneko, J.; Hasegawa, K.; Kokudo, N. Fluorescent Cholangiography Illuminating the Biliary Tree during Laparoscopic Cholecystectomy. *British Journal of Surgery* **2010**, *97* (9), 1369–1377. <https://doi.org/10.1002/bjs.7125>.
 - (27) Purich, K.; Dang, J. T.; Poonja, A.; Sun, W. Y. L.; Bigam, D.; Birch, D.; Karmali, S. Intraoperative Fluorescence Imaging with Indocyanine Green in Hepatic Resection for Malignancy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies. *Surg Endosc* **2020**, *34* (7), 2891–2903. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07543-2>.
 - (28) Rompianesi, G.; Montalti, R.; Giglio, M. C.; Ceresa, C. D. L.; Nasto, R. A.; De Simone, G.; Troisi, R. I. Systematic Review, Meta-Analysis and Single-Centre Experience of the Diagnostic Accuracy of Intraoperative near-Infrared Indocyanine Green-Fluorescence in Detecting Pancreatic Tumours. *HPB (Oxford)* **2022**, *24* (11), 1823–1831. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2022.05.004>.
 - (29) Gilmore, D. M.; Khullar, O. V.; Jaklitsch, M. T.; Chirieac, L. R.; Frangioni, J. V.; Colson, Y. L.

- Identification of Metastatic Nodal Disease in a Phase 1 Dose-Escalation Trial of Intraoperative Sentinel Lymph Node Mapping in Non-Small Cell Lung Cancer Using near-Infrared Imaging. J Thorac Cardiovasc Surg* **2013**, 146 (3), 562–570; discussion 569-570. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.04.010>.
- (30) Siddighi, S.; Yune, J. J.; Hardesty, J. *Indocyanine Green for Intraoperative Localization of Ureter. American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2014**, 211 (4), 436.e1-436.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.05.017>.
- (31) Schols, R. M.; Dip, F.; Lo Menzo, E.; Haddock, N. T.; Landin, L.; Lee, B. T.; Malagón, P.; Masia, J.; Mathes, D. W.; Nahabedian, M. Y.; Neligan, P. C.; Newman, M. I.; Phillips, B. T.; Pons, G.; Pruijboom, T.; Qiu, S. S.; Ritschl, L. M.; Rozen, W. M.; Saint-Cyr, M.; Song, S. Y.; van der Hulst, R. R. W. J.; Venturi, M. L.; Wongkietkachorn, A.; Yamamoto, T.; White, K. P.; Rosenthal, R. J. *Delphi Survey of Intercontinental Experts to Identify Areas of Consensus on the Use of Indocyanine Green Angiography for Tissue Perfusion Assessment during Plastic and Reconstructive Surgery. Surgery* **2022**, 172 (6S), S46–S53. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2022.04.015>.
- (32) Granieri, S.; Bracchetti, G.; Kersik, A.; Frassini, S.; Germini, A.; Bonomi, A.; Lomaglio, L.; Gjoni, E.; Frontali, A.; Bruno, F.; Paleino, S.; Cotsoglou, C. *Preoperative Indocyanine Green (ICG) Clearance Test: Can We Really Trust It to Predict Post Hepatectomy Liver Failure? A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. Photodiagnosis Photodyn Ther* **2022**, 40, 103170. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103170>.
- (33) Heiliger, C.; Piecuch, J.; Frank, A.; Andrade, D.; Von Ehrlich-Treuenstätt, V.; Schiergens, T.; Rentsch, M.; Werner, J.; Karcz, K. *Intraarterial Indocyanine Green (ICG) Fluorescence Augmentation by Marking Embryonal Resection Areas in Colorectal Surgery: A Feasibility Study in a Porcine Model. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* **2019**, 28 (6), 321–325. <https://doi.org/10.1080/13645706.2018.1544568>.
- (34) Heiliger, C.; Piecuch, J.; Frank, A.; Andrade, D.; Ehrlich-Treuenstätt, V. V.; Schiergens, T.; Rentsch, M.; Werner, J.; Karcz, K. *Intraarterial Indocyanine Green (ICG) Fluorescence Augmentation by Marking Embryonal Resection Areas in Colorectal Surgery: A Feasibility Study in a Porcine Model. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* **2018**, 1–5. <https://doi.org/10.1080/13645706.2018.1544568>.
- (35) Diana, M.; Liu, Y.-Y.; Pop, R.; Kong, S.-H.; Legnèr, A.; Beaujeux, R.; Pessaux, P.; Soler, L.; Mutter, D.; Dallemagne, B.; Marescaux, J. *Superselective Intra-Arterial Hepatic Injection of Indocyanine Green (ICG) for Fluorescence Image-Guided Segmental Positive Staining: Experimental Proof of the Concept. Surgical Endoscopy* **2017**, 31 (3), 1451–1460. <https://doi.org/10.1007/s00464-016-5136-y>.
- (36) Ono, H.; Kusano, M.; Kawamata, F.; Danjo, Y.; Kawakami, M.; Nagashima, K.; Nishihara, H. *Intraoperative Localization of Arteriovenous Malformation of a Jejunum with Combined Use of Angiographic Methods and Indocyanine Green Injection: Report of a New Technique. International Journal of Surgery Case Reports* **2016**, 29, 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2016.10.030>.
- (37) Liu, Y.-Y.; Pop, R.; Diana, M.; Kong, S.-H.; Lègner, A.; Beaujeux, R.; Marescaux, J. *Real-Time Fluorescence Angiography by Intra-Arterial Indocyanine Green Injection to Identify Obscure Gastrointestinal Bleeding Territory: Proof of Concept in the Porcine Model. Surgical Endoscopy* **2016**, 30 (5), 2143–2150. <https://doi.org/10.1007/s00464-015-4460-y>.
- (38) Igari, K.; Kudo, T.; Uchiyama, H.; Toyofuku, T.; Inoue, Y. *Intraarterial Injection of Indocyanine Green for Evaluation of Peripheral Blood Circulation in Patients with*

- Peripheral Arterial Disease. *Ann Vasc Surg* **2014**, 28 (5), 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2013.12.036>.
- (39) Kalmar, C. L.; Reed, C. M.; Peery, C. L.; Salzberg, A. D. Intraluminal Indocyanine Green for Intraoperative Staple Line Leak Testing in Bariatric Surgery. *Surg Endosc* **2020**, 34 (9), 4194–4199. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07606-4>.
- (40) Ahn, H.-M.; Son, G. M.; Lee, I. Y.; Shin, D.-H.; Kim, T. K.; Park, S. B.; Kim, H. W. Optimal ICG Dosage of Preoperative Colonoscopic Tattooing for Fluorescence-Guided Laparoscopic Colorectal Surgery. *Surg Endosc* **2022**, 36 (2), 1152–1163. <https://doi.org/10.1007/s00464-021-08382-5>.
- (41) Barberio, M.; Pizzicannella, M.; Spota, A.; Ashoka, A. H.; Agnus, V.; Al Taher, M.; Jansen-Winkel, B.; Gockel, I.; Marescaux, J.; Swanström, L.; Kong, S.-H.; Felli, E.; Klymchenko, A.; Diana, M. Preoperative Endoscopic Marking of the Gastrointestinal Tract Using Fluorescence Imaging: Submucosal Indocyanine Green Tattooing versus a Novel Fluorescent over-the-Scope Clip in a Survival Experimental Study. *Surg Endosc* **2021**, 35 (9), 5115–5123. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07999-2>.
- (42) Barberio, M.; Al-Taher, M.; Felli, E.; Ashoka, A. H.; Marescaux, J.; Klymchenko, A.; Diana, M. Intraoperative Ureter Identification with a Novel Fluorescent Catheter. *Sci Rep* **2021**, 11 (1), 4501. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84121-z>.
- (43) McLEAN, D. H.; Buncke, H. J. AUTOTRANSPLANT OF OMENTUM TO A LARGE SCALP DEFECT, WITH MICROSURGICAL REVASCULARIZATION: *Plastic and Reconstructive Surgery* **1972**, 49 (3), 268–274. <https://doi.org/10.1097/00006534-197203000-00005>.
- (44) Mücke, T.; Rau, A.; Weitz, J.; Ljubic, A.; Rohleder, N.; Wolff, K.-D.; Mitchell, D. A.; Kesting, M. R. Influence of Irradiation and Oncologic Surgery on Head and Neck Microsurgical Reconstructions. *Oral Oncol* **2012**, 48 (4), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.11.013>.
- (45) Schultze-Mosgau, S.; Grabenbauer, G. G.; Radespiel-Tröger, M.; Wiltfang, J.; Ries, J.; Neukam, F. W.; Rödel, F. Vascularization in the Transition Area between Free Grafted Soft Tissues and Pre-Irradiated Graft Bed Tissues Following Preoperative Radiotherapy in the Head and Neck Region. *Head Neck* **2002**, 24 (1), 42–51. <https://doi.org/10.1002/hed.10012>.
- (46) Urken, M. L.; Weinberg, H.; Buchbinder, D.; Moscoso, J. F.; Lawson, W.; Catalano, P. J.; Biller, H. F. Microvascular Free Flaps in Head and Neck Reconstruction. Report of 200 Cases and Review of Complications. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **1994**, 120 (6), 633–640. <https://doi.org/10.1001/archotol.1994.01880300047007>.
- (47) Klug, C.; Berzaczy, D.; Reinbacher, H.; Voracek, M.; Rath, T.; Millesi, W.; Ewers, R. Influence of Previous Radiotherapy on Free Tissue Transfer in the Head and Neck Region: Evaluation of 455 Cases. *Laryngoscope* **2006**, 116 (7), 1162–1167. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000227796.41462.a1>.
- (48) Mücke, T.; Wagenpfeil, S.; Kesting, M. R.; Hölzle, F.; Wolff, K. D. Recurrence Interval Affects Survival after Local Relapse of Oral Cancer. *Oral Oncology* **2009**, 45 (8), 687–691.
- (49) Iwasawa, M.; Furuta, S.; Noguchi, M.; Hirose, T. Reconstruction of Fingertip Deformities of the Thumb Using a Venous Flap. *Ann Plast Surg* **1992**, 28 (2), 187–189. <https://doi.org/10.1097/00000637-199202000-00011>.
- (50) Cho, B. C.; Lee, J. H.; Byun, J. S.; Baik, B. S. Clinical Applications of the Delayed Arterialized Venous Flap. *Annals of plastic surgery* **1997**, 39 (2), 145–157.
- (51) Tsai, T. M.; Matiko, J. D.; Breidenbach, W.; Kutz, J. E. Venous Flaps in Digital Revascularization and Replantation. *J Reconstr Microsurg* **1987**, 3 (2), 113–119. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1006973>.

- (52) Yilmaz, M.; Menderes, A.; Karaca, C.; Barutçu, A. Free Arterialized Venous Forearm Flap. *Ann Plast Surg* **1995**, 34 (1), 88–91. <https://doi.org/10.1097/00000637-199501000-00019>.
- (53) Kayalar, M.; Kucuk, L.; Sugun, T. S.; Gurbuz, Y.; Savran, A.; Kaplan, I. Clinical Applications of Free Arterialized Venous Flaps. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* **2014**, 1548–1556. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.05.061>.
- (54) Yan, H.; Brooks, D.; Jackson, W. D.; Angel, M. F.; Akdemir, O.; Zhang, F. Improvement of Prearterialized Venous Flap Survival with Delay Procedure in Rats. *J Reconstr Microsurg* **2010**, 26 (3), 193–200. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247715>.
- (55) Wungcharoen, B.; Santidhananon, Y.; Chongchet, V. Pre-Arterialisation of an Arterialised Venous Flap: Clinical Cases. *Br J Plast Surg* **2001**, 54 (2), 112–116. <https://doi.org/10.1054/bjps.2000.3513>.
- (56) Fukui, A.; Inada, Y.; Murata, K.; Ueda, Y.; Tamai, S. A Method for Prevention of Arterialized Venous Flap Necrosis. *J Reconstr Microsurg* **1998**, 14 (1), 67–74. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1006904>.
- (57) Chavoïn, J. P.; Rouge, D.; Vachaud, M.; Boccalon, H.; Costagliola, M. Island Flaps with an Exclusively Venous Pedicle. A Report of Eleven Cases and a Preliminary Haemodynamic Study. *Br J Plast Surg* **1987**, 40 (2), 149–154. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(87\)90187-1](https://doi.org/10.1016/0007-1226(87)90187-1).
- (58) Nakayama, Y.; Soeda, S.; Kasai, Y. Flaps Nourished by Arterial Inflow through the Venous System: An Experimental Investigation. *Plastic and reconstructive surgery* **1981**, 67 (3), 328–334.
- (59) Wolff, K. D.; Telzrow, T.; Rudolph, K. H.; Franke, J.; Wartenberg, E. Isotope Perfusion and Infrared Thermography of Arterialised, Venous Flow-through and Pedicled Venous Flaps. *Br J Plast Surg* **1995**, 48 (2), 61–70. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(95\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0007-1226(95)90098-5).
- (60) Deune, E. G.; Rodriguez, E.; Hatef, D.; Frassica, F. Arterialized Venous Flow-through Flap for Simultaneous Reconstruction of a Radial Artery Defect and Palmar Forearm Soft-Tissue Loss from Sarcoma Resection. *Journal of Reconstructive Microsurgery* **2005**, 21 (2), 85–91.
- (61) Kayıkçıoğlu, A.; Akyürek, M.; Safak, T.; Ozkan, O.; Keçik, A. Arterialized Venous Dorsal Digital Island Flap for Fingertip Reconstruction.; Department of Plastic and Reconstructive Surgery at Hacettepe University Medical School, Ankara, Turkey., 1998; Vol. 102, pp 2368–2372; discussion 2373.
- (62) Woo, S.-H.; Kim, K.-C.; Lee, G.-J.; Ha, S.-H.; Kim, K.-H.; Dhawan, V.; Lee, K. S. A Retrospective Analysis of 154 Arterialized Venous Flaps for Hand Reconstruction: An 11-Year Experience. *Plastic and reconstructive surgery* **2007**, 119 (6), 1823–1838.
- (63) Safak, T.; Akyürek, M. Cephalic Vein-Pedicled Arterialized Anteromedial Arm Venous Flap for Head and Neck Reconstruction. *Ann Plast Surg* **2001**, 47 (4), 446–449. <https://doi.org/10.1097/00000637-200110000-00016>.
- (64) Klein, C. [Experiences with an arterialized venous flap for intraoral defect reconstruction]. *Zentralbl Chir* **2000**, 125 (1), 51–55.
- (65) Seyhan, T.; Deniz, M.; Borman, H.; Güzel, B. U.; Cağlar, B. Comparison of Two Different Vascular Delay Methods in a Rat Cranial Epigastric Perforator Flap Model. *Annals of plastic surgery* **2010**, 64 (1), 89–92. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181951720>.
- (66) Mounsey, R. A.; Pang, C. Y.; Forrest, C. Preconditioning: A New Technique for Improved Muscle Flap Survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* **1992**, 107 (4), 549–552. <https://doi.org/10.1177/019459989210700406>.
- (67) Heald, R. J.; Husband, E. M.; Ryall, R. D. H. The Mesorectum in Rectal Cancer Surgery—the

- Clue to Pelvic Recurrence? *British Journal of Surgery* **1982**, 69 (10), 613–616. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800691019>.
- (68) E.V, D. D. G. für H. und M. O. Rektumkarzinom - Leitlinie. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen **2016**.
- (69) Hermanek, P.; Hermanek, P.; Hohenberger, W.; Klimpfinger, M.; Köckerling, F.; Papadopoulos, T. The Pathological Assessment of Mesorectal Excision: Implications for Further Treatment and Quality Management. *Int J Colorectal Dis* **2003**, 18 (4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00384-002-0468-6>.
- (70) Heald, R. J.; Ryall, R. D. H. RECURRENCE AND SURVIVAL AFTER TOTAL MESORECTAL EXCISION FOR RECTAL CANCER. *The Lancet* **1986**, 327 (8496), 1479–1482. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91510-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91510-2).
- (71) Grinnell, R. S. Lymphatic Block with Atypical and Retrograde Lymphatic Metastasis and Spread in Carcinoma of the Colon and Rectum. *Annals of surgery* **1966**, 163 (2), 272–280.
- (72) Ding, J.; Liao, G.; Xia, Y.; Zhang, Z.; Pan, Y.; Liu, S.; Zhang, Y.; Yan, Z. Medial versus Lateral Approach in Laparoscopic Colorectal Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World journal of surgery* **2013**, 37 (4), 863–872. <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1888-2>.
- (73) Taylor, G. I. Nerve Grafting with Simultaneous Microvascular Reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* **1978**, No. 133, 56–70.
- (74) Taylor, G. I. Reconstruction of the Mandible with Free Composite Iliac Bone Grafts. *Ann Plast Surg* **1982**, 9 (5), 361–376. <https://doi.org/10.1097/00000637-198211000-00003>.
- (75) Bootz, F.; Preyer, S. [Microvascular tissue transplantation in plastic reconstruction of the external head-neck area]. *Laryngorhinootologie* **1994**, 73 (10), 538–542. <https://doi.org/10.1055/s-2007-997190>.
- (76) Mücke, T.; Reeps, C.; Wolff, K. D.; Mitchell, D. A.; Fichter, A. M.; Scholz, M. Objective Qualitative and Quantitative Assessment of Blood Flow with Near-Infrared Angiography in Microvascular Anastomoses in the Rat Model. *Microsurgery* **2013**, 33 (4), 287–296.
- (77) Takeshita, S.; Isshiki, T.; Mori, H.; Tanaka, E.; Tanaka, A.; Umetani, K.; Eto, K.; Miyazawa, Y.; Ochiai, M.; Sato, T. Microangiographic Assessment of Collateral Vessel Formation Following Direct Gene Transfer of Vascular Endothelial Growth Factor in Rats. *Cardiovasc Res* **1997**, 35 (3), 547–552. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00157-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00157-0).
- (78) Bui, D. T.; Cordeiro, P. G.; Hu, Q.-Y.; Disa, J. J.; Pusic, A.; Mehrara, B. J. Free Flap Reexploration: Indications, Treatment, and Outcomes in 1193 Free Flaps. *Plast Reconstr Surg* **2007**, 119 (7), 2092–2100. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000260598.24376.e1>.
- (79) Yoshimura, M.; Shimada, T.; Imura, S.; Shimamura, K.; Yamauchi, S. The Venous Skin Graft Method for Repairing Skin Defects of the Fingers. *Plast Reconstr Surg* **1987**, 79 (2), 243–250. <https://doi.org/10.1097/00006534-198702000-00016>.
- (80) Thatte, M. R.; Thatte, R. L. Venous Flaps. *Plast Reconstr Surg* **1993**, 91 (4), 747–751. <https://doi.org/10.1097/00006534-199304000-00033>.
- (81) Xiu, Z. F.; Chen, Z. J. The Microcirculation and Survival of Experimental Flow-through Venous Flaps. *Br J Plast Surg* **1996**, 49 (1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/s0007-1226\(96\)90185-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1226(96)90185-x).
- (82) Kansy, K.; Mueller, A. A.; Mücke, T.; Kopp, J.-B.; Koersgen, F.; Wolff, K. D.; Zeilhofer, H.-F.; Hölzle, F.; Pradel, W.; Schneider, M.; Kolk, A.; Smeets, R.; Acero, J.; Hoffmann, J. Microsurgical Reconstruction of the Head and Neck - Current Concepts of Maxillofacial Surgery in Europe. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* **2014**.

- <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2014.04.030>.
- (83) Mücke, T.; Müller, A. A.; Kansy, K.; Hallermann, W.; Kerkmann, H.; Schuck, N.; Zeilhofer, H.-F.; Hoffmann, J.; Hölzle, F.; DÖSAK collaborative group for Microsurgical Reconstruction. *Microsurgical Reconstruction of the Head and Neck--Current Practice of Maxillofacial Units in Germany, Austria, and Switzerland. J Craniomaxillofac Surg* **2011**, *39* (6), 449–452. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2010.10.019>.
- (84) Suzuki, Y.; Suzuki, K.; Ishikawa, K. *Direct Monitoring of the Microcirculation in Experimental Venous Flaps with Afferent Arteriovenous Fistulas. Br J Plast Surg* **1994**, *47* (8), 554–559. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(94\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0007-1226(94)90139-2).
- (85) Yan, H.; Kolkin, J.; Zhao, B.; Li, Z.; Jiang, S.; Wang, W.; Xia, Z.; Fan, C. *The Effect of Hemodynamic Remodeling on the Survival of Arterialized Venous Flaps. PLoS One* **2013**, *8* (11), e79608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079608>.
- (86) Lee, L. N.; Smith, D. F.; Boahene, K. D.; Byrne, P. J. *Intraoperative Laser-Assisted Indocyanine Green Imaging for Objective Measurement of the Vascular Delay Technique in Locoregional Head and Neck Flaps. JAMA facial plastic surgery* **2014**, *16* (5), 343–347.
- (87) Murry, C. E.; Jennings, R. B.; Reimer, K. A. *Preconditioning with Ischemia: A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. Circulation* **1986**, *74* (5), 1124–1136. <https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124>.
- (88) Keller, D. S.; Ishizawa, T.; Cohen, R.; Chand, M. *Indocyanine Green Fluorescence Imaging in Colorectal Surgery: Overview, Applications, and Future Directions. The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2017**, *2* (10), 757–766. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30216-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30216-9).
- (89) Diana, M.; Agnus, V.; Halvax, P.; Liu, Y.-Y.; Dallemagne, B.; Schlagowski, A.-I.; Geny, B.; Diemunsch, P.; Lindner, V.; Marescaux, J. *Intraoperative Fluorescence-Based Enhanced Reality Laparoscopic Real-Time Imaging to Assess Bowel Perfusion at the Anastomotic Site in an Experimental Model. British Journal of Surgery* **2015**, *102* (2), e169–e176. <https://doi.org/10.1002/bjs.9725>.
- (90) Jafari, M. D.; Wexner, S. D.; Martz, J. E.; McLemore, E. C.; Margolin, D. A.; Sherwinter, D. A.; Lee, S. W.; Senagore, A. J.; Phelan, M. J.; Stamos, M. J. *Perfusion Assessment in Laparoscopic Left-Sided/Anterior Resection (PILLAR II): A Multi-Institutional Study. J Am Coll Surg* **2015**, *220* (1), 82–92.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2014.09.015>.
- (91) Nishigori, N.; Koyama, F.; Nakagawa, T.; Nakamura, S.; Ueda, T.; Inoue, T.; Kawasaki, K.; Obara, S.; Nakamoto, T.; Fujii, H.; Nakajima, Y. *Visualization of Lymph/Blood Flow in Laparoscopic Colorectal Cancer Surgery by ICG Fluorescence Imaging (Lap-IGFI). Annals of Surgical Oncology* **2016**, *23* (S2), 266–274. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4509-0>.
- (92) Boni, L.; David, G.; Mangano, A.; Dionigi, G.; Rausei, S.; Spampatti, S.; Cassinotti, E.; Fingerhut, A. *Clinical Applications of Indocyanine Green (ICG) Enhanced Fluorescence in Laparoscopic Surgery. Surgical Endoscopy* **2015**, *29* (7), 2046–2055. <https://doi.org/10.1007/s00464-014-3895-x>.
- (93) Ishizawa, T.; Fukushima, N.; Shibahara, J.; Masuda, K.; Tamura, S.; Aoki, T.; Hasegawa, K.; Beck, Y.; Fukayama, M.; Kokudo, N. *Real-Time Identification of Liver Cancers by Using Indocyanine Green Fluorescent Imaging. Cancer* **2009**, *115* (11), 2491–2504. <https://doi.org/10.1002/cncr.24291>.
- (94) Ryu, S.; Yoshida, M.; Hironori, O.; Tsutsui, N.; Suzuki, N.; Ito, E.; Nakajima, K.; Yanagisawa, S.; Kitajima, M.; Suzuki, Y. *Intraoperative ICG Fluorescence Contrast Imaging of the Main Artery Watershed Area in Colorectal Cancer Surgery: Report of a Case. International Journal of Surgery Case Reports* **2016**, *26*, 176–178.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2016.06.009>.
- (95) Ishizawa, T.; Tamura, S.; Masuda, K.; Aoki, T.; Hasegawa, K.; Imamura, H.; Beck, Y.; Kokudo, N. Intraoperative Fluorescent Cholangiography Using Indocyanine Green: A Biliary Road Map for Safe Surgery. *Journal of the American College of Surgeons* **2009**, 208 (1), e1–e4. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.024>.
- (96) Cassinotti, E.; Al-Taher, M.; Antoniou, S. A.; Arezzo, A.; Baldari, L.; Boni, L.; Bonino, M. A.; Bouvy, N. D.; Brodie, R.; Carus, T.; Chand, M.; Diana, M.; Eussen, M. M. M.; Francis, N.; Guida, A.; Gontero, P.; Haney, C. M.; Jansen, M.; Mintz, Y.; Morales-Conde, S.; Muller-Stich, B. P.; Nakajima, K.; Nickel, F.; Oderda, M.; Parise, P.; Rosati, R.; Schijven, M. P.; Silecchia, G.; Soares, A. S.; Urakawa, S.; Vettoretto, N. European Association for Endoscopic Surgery (EAES) Consensus on Indocyanine Green (ICG) Fluorescence-Guided Surgery. *Surg Endosc* **2023**. <https://doi.org/10.1007/s00464-023-09928-5>.
- (97) Van Den Hoven, P.; Osterkamp, J.; Nerup, N.; Svendsen, M. B. S.; Vahrmeijer, A.; Van Der Vorst, J. R.; Achiam, M. P. Quantitative Perfusion Assessment Using Indocyanine Green during Surgery - Current Applications and Recommendations for Future Use. *Langenbecks Arch Surg* **2023**, 408 (1), 67. <https://doi.org/10.1007/s00423-023-02780-0>.
- (98) Refaat, A.; Yap, M. L.; Pietersz, G.; Walsh, A. P. G.; Zeller, J.; Del Rosal, B.; Wang, X.; Peter, K. In Vivo Fluorescence Imaging: Success in Preclinical Imaging Paves the Way for Clinical Applications. *J Nanobiotechnology* **2022**, 20 (1), 450. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01648-7>.
- (99) FDA Approval. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pafolacianine-identifying-malignant-ovarian-cancer-lesions> (accessed 2023-02-19).
- (100) Harlaar, N. J.; Koller, M.; de Jongh, S. J.; van Leeuwen, B. L.; Hemmer, P. H.; Kruijff, S.; van Ginkel, R. J.; Been, L. B.; de Jong, J. S.; Kats-Ugurlu, G.; Linssen, M. D.; Jorritsma-Smit, A.; van Oosten, M.; Nagengast, W. B.; Ntziachristos, V.; van Dam, G. M. Molecular Fluorescence-Guided Surgery of Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin: A Single-Centre Feasibility Study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2016**, 1 (4), 283–290. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30082-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30082-6).
- (101) Meijer, R. P. J.; de Valk, K. S.; Deken, M. M.; Boogerd, L. S. F.; Hoogstins, C. E. S.; Bhairosingh, S. S.; Swijnenburg, R.-J.; Bonsing, B. A.; Framery, B.; Fariña Sarasqueta, A.; Putter, H.; Hilling, D. E.; Burggraaf, J.; Cailler, F.; Mieog, J. S. D.; Vahrmeijer, A. L. Intraoperative Detection of Colorectal and Pancreatic Liver Metastases Using SGM-101, a Fluorescent Antibody Targeting CEA. *Eur J Surg Oncol* **2021**, 47 (3 Pt B), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.10.034>.
- (102) Rosenthal, E. L.; Moore, L. S.; Tipirneni, K.; de Boer, E.; Stevens, T. M.; Hartman, Y. E.; Carroll, W. R.; Zinn, K. R.; Warram, J. M. Sensitivity and Specificity of Cetuximab-IRDye800CW to Identify Regional Metastatic Disease in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* **2017**, 23 (16), 4744–4752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2968>.
- (103) Heiliger, C.; Ritschl, L. M.; Fichter, A. M.; Postl, L. K.; Kanatas, A.; Wolff, K. D.; Mücke, T. Conditioning of Microvascular Venous Flaps in Rats. *Sci Rep* **2023**, 13 (1), 1029. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28054-9>.