

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch

**Effekte vaso- und gerinnungsaktiver Pharmaka auf die Überlebens-
rate gefährdeter freier mikrochirurgischer
Haut-, Weichteiltransplantate bei der Ratte**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christiane Birk
aus
Ravensburg
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Frick

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Grantzow
Prof. Dr. med. Markus Braun-Falco
Prof. Dr. med. Riccardo Giunta

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Jens Wallmichrath

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die freie mikrochirurgische Gewebetransplantation	9
1.1.1	Unterteilung der Weichteillappen	10
1.2	Intraoperative und postoperative Komplikationen.....	10
1.3	Virchow-Trias.....	11
1.4	Nicht-medikamentöse Reduzierung der postoperativen Komplikationen	12
1.5	Medikamentöse Einflussnahme auf postoperative Komplikationen	12
1.5.1	Heparin	13
1.5.2	Prostazykline	13
1.5.3	Rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator (rtPA, ein Fibrinolytikum)	13
2	Fragestellung und Ziel der Studie	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Versuchstiere	17
3.2	Versuchsablauf	17
3.3	Durchführung der Transplantation.....	17
3.3.1	Vorbereitungen des Versuchstieres	17
3.3.2	Leistenlappenhebung.....	18
3.3.3	Transplantation des freien Leistenlappens an den Hals	19
3.4	Durchführung des Versuchs	21
3.4.1	Substanzen für die Intravitalmikroskopie	21
3.4.1.1	Plasma-Farbstoff	21
3.4.1.2	Substanzen für Test-Thrombozyten.....	21
3.4.2	Gewinnung und Aufbereitung der Test-Thrombozyten.....	22
3.4.2.1	Gewinnung von Spenderblut	22

3.4.2.2	Aufbereitung der Thrombozyten des Spendertiers	22
3.4.3	Trüfsubstanzen	23
3.4.3.1	Tutofusin	23
3.4.3.2	Heparin.....	23
3.4.3.3	rtPA	23
3.4.4	Versuchsgruppen.....	24
3.5	Vorbereitung des Testtiers	24
3.5.1	Infusion der Versuchslösungen beim Versuchstier	25
3.5.1.1	Dosierung von Tutofusin	26
3.5.1.2	Dosierung von Heparin	26
3.5.1.3	Dosierung von rtPA	26
3.5.2	Abklemmen der Transplantatvene.....	26
3.5.3	Intravitalmikroskopie	28
3.5.3.1	Vorbereitungen	28
3.5.3.2	Mikroskopie der gefärbten Thrombozyten	28
3.5.3.3	Mikroskopie des angefärbten Plasmas	29
3.5.3.4	Nacharbeiten.....	29
3.5.4	Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen	29
3.5.4.1	Bestimmung der Thrombozytenanzahl.....	30
3.5.4.2	Bestimmung der funktionellen Kapillardichte	30
3.5.4.3	Bestimmung der Kapillardurchmesser.....	31
3.5.5	Makroskopische Beurteilung.....	31
4	Statistische Auswertung.....	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Unbehandelte Kontrollgruppen	33
5.1.1	Funktionelle Kapillardichte.....	34

5.1.2	Kapillardurchmesser.....	35
5.1.3	Adhärente Thrombozyten	36
5.1.4	Fließende Thrombozyten	37
5.1.5	Vitalität der Transplantate	38
5.2	Heparin	39
5.2.1	Funktionelle Kapillardichte.....	39
5.2.2	Kapillardurchmesser.....	41
5.2.3	Adhärente Thrombozyten	43
5.2.4	Fließende Thrombozyten	45
5.2.5	Vitalität der Transplantate	47
5.2.5.1	Kontrollgruppen versus Heparin.....	47
5.3	Rekombinanter tissue-type Plasminogen-Aktivator (rtPA).....	48
5.3.1	Funktionelle Kapillardichte.....	48
5.3.2	Kapillardurchmesser.....	50
5.3.3	Adhärente Thrombozyten	52
5.3.4	Fließende Thrombozyten	54
5.3.5	Vitalität der Transplantate	56
5.3.5.1	Kontrollgruppe A versus rtPA	56
5.3.5.2	Kontrollgruppe B versus rtPA.....	56
6	Diskussion	58
6.1	Ziel der Studie	58
6.2	Ergebnisse.....	59
6.2.1	Kontrollgruppen	59
6.2.2	Heparin	59
6.2.2.1	Kapillardichte bei Heparin im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen	59

6.2.2.2	Kapillardurchmesser bei Heparin im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen	59
6.2.2.3	Fließende Thrombozyten bei Heparin im Vergleich mit der Kontrollgruppe A	59
6.2.2.4	Adhärente Thrombozyten bei Heparin im Vergleich mit den Kontrollgruppen	59
6.2.3	rtPA.....	60
6.2.3.1	Kapillardichte bei rtPA im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen	60
6.2.3.2	Kapillardurchmesser bei rtPA im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen ..	60
6.2.3.3	Fließende Thrombozyten bei rtPA im Vergleich mit den Kontrollgruppen	60
6.2.3.4	Adhärente Thrombozyten bei rtPA im Vergleich mit den Kontrollgruppen	60
6.3	Methodik / Methodenkritik.....	60
6.3.1	Modell und Versuchstiere	60
6.3.2	Methode / Präparation	61
6.3.3	Prüfsubstanzen.....	61
6.3.4	Venöse Stase	62
6.3.5	Intravitalmikroskopie (IVM)	63
6.3.6	Thrombozyten-Färbung.....	63
6.3.7	Plasmafärbung.....	64
6.3.8	Computergesteuerte Auswertung	64
6.4	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur.....	66
6.4.1	Zeiten und Intervalle primärer und sekundärer Ischämie	66
6.4.2	Heparin	67
6.4.3	rtPA.....	71
6.5	Bedeutung der Ergebnisse.....	74

6.5.1	Mechanismen primärer und sekundärer Ischämie	74
6.5.2	Heparin	76
6.5.3	rtPA.....	80
6.6	Schlussfolgerung.....	81
7	Zusammenfassung	83
8	Literaturverzeichnis	84
9	Tabellen.....	97
9.1	Testtiere ohne Infusion (Kontrollgruppe A)	97
9.1.1	Kapillardichte.....	97
9.1.2	Kapillardurchmesser.....	97
9.1.3	Adhärente Thrombozyten	98
9.1.4	Fließende Thrombozyten	98
9.2	Testtiere mit Infusion von Tutofusin (Kontrollgruppe B)	99
9.2.1	Kapillardichte.....	99
9.2.2	Kapillardurchmesser.....	100
9.2.3	Adhärente Thrombozyten	100
9.2.4	Fließende Thrombozyten	101
9.3	Testtiere mit Infusion von Heparin (Testgruppe C).....	102
9.3.1	Kapillardichte.....	102
9.3.2	Kapillardurchmesser.....	103
9.3.3	Adhärente Thrombozyten	104
9.3.4	Fließende Thrombozyten	105
9.4	Testtiere mit Infusion von rtPA (Testgruppe D)	106
9.4.1	Kapillardichte.....	106
9.4.2	Kapillardurchmesser.....	107
9.4.3	Adhärente Thrombozyten	108

9.4.4	Fließende Thrombozyten	109
9.5	Bilder.....	110
9.5.1	Funktionelle Kapillardichte.....	110
9.5.2	Adhärente Thrombozyten	111
9.5.3	Fließende Thrombozyten	113
10	Abbildungsverzeichnis	114
11	Tabellenverzeichnis.....	118
12	Danksagung.....	120

1 Einleitung

1.1 Die freie mikrochirurgische Gewebetransplantation

Große Haut-Weichteildefekte können durch ein Trauma oder eine Resektion von verändertem Gewebe entstehen und stellen immer wieder eine Herausforderung für die plastisch-chirurgische Defektdeckung dar. Eine rasche und sichere Wundbedeckung ist wichtig, um schlecht heilende oder infizierte Weichteildefekte zu verhindern.

Häufig können Defekte in bestimmten Körperregionen wegen eines lokalen Gewebemangels durch sogenannte Nahlappenplastiken nicht verschlossen werden (Henne-Bruns D, 2003). Die fehlende Barrierefunktion der Haut sowie freiliegende und oft schlecht durchblutete tiefere Strukturen wie z.B. Sehnen und Knochen erfordern dann eine dringliche Defektdeckung mit gut durchblutetem Gewebe aus weiter entfernten Körperregionen. Hierzu muss ein durchbluteter Gewebelappen, der von einem eigenen axialen Blutgefäßstiel ernährt wird, gehoben und „frei“ transplantiert werden. Der Gefäßstiel wird mit seinen Enden an ein Gefäßbündel im Empfängergebiet unter dem Operationsmikroskop angeschlossen (anastomosiert).

Bereits 1960 beschrieben Jacobson und Suarez die ersten vaskulären Mikroanastomosen. Sie führten mikrochirurgische Operationstechniken ein, verbesserten die Instrumentation und Operationsmikroskope. (Germain MA, 2001)

Der Gebrauch des Operationsmikroskops hat viele neue Möglichkeiten in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie eröffnet. Mikrovaskuläre Chirurgie schien eine Technik für eine Vielzahl an Anwendungen darzustellen. Der Transfer von Lappen und die Revaskularisation durch mikrovaskuläre Anastomosen der Gefäßstiele bedeuteten den Beginn der freien Lappen. In wenigen Jahrzehnten sind die mikrochirurgischen Techniken in der plastischen Chirurgie voll ausgereift. (Bos, 2000)

Die Möglichkeit der Anastomose von Gefäßen von weniger als 1 mm Durchmesser erlaubte den entfernten Transfer von Gewebe mit einer bekannten Blutversorgung von einer Stelle des Körpers zu einer anderen. (Miller CW, 1990)

Die mikrovaskuläre Chirurgie wurde eine wichtige Methode zur Rekonstruktion komplexer chirurgischer Defekte durch freie vaskularisierte Transplantate. Die Mehrheit der freien Lappen wird angewandt, um Defekte zu rekonstruieren, die aufgrund einer Tumor-

entfernung oder einem Trauma resultieren. (Germain MA, 2001)

Die gute Vaskularisation kann auch als Basis zur Ausheilung chronischer Infektionen dienen. Selbst gewichtstragende Partien wie Ferse und Sohle lassen sich durch eine Rekonstruktion mit sensibel innervierten Transplantaten erfolgreich behandeln und halten einer späteren funktionellen Belastung stand. (Noever G, 1986) (Frick A, 1999)

1.1.1 Unterteilung der Weichteillappen

Weichteillappen können unter anderem nach der Art der Blutversorgung unterteilt werden. Zum einen gibt es willkürlich gebildete (random pattern) und axiale Lappenplastiken, bei denen Blutgefäße und Nerven nicht durchtrennt werden müssen, da der Gewebelappen ortsnah geschwenkt wird. (Henne-Bruns D, 2003)

Zum anderen gibt es freie Lappenplastiken, bei denen die versorgenden Gefäße des transponierten Lappens an die Blutversorgung im Empfängergebiet mittels Mikroanastomosen angeschlossen werden. (Henne-Bruns D, 2003)

1.2 Intraoperative und postoperative Komplikationen

Nach der Hebung des freien Lappens wird dieser unweigerlich einer Ischämiezeit ausgesetzt. Man nennt dies primäre Ischämie. (Angel MF, 1991)

Die Reperfusion von ischämischem Gewebe nach Eröffnung des arteriellen Zustroms im Empfängerareal resultiert in einem lokalen oder systemischen Schaden, der assoziiert ist mit der Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Leukozyten, lokale Mediatoren, Thromboxan, Komplement und Zytokinen. Ischämie/Reperfusion stört die empfindliche Balance, die die Homöostase in der mikrovaskulären Perfusion aufrecht erhält (Jokuszies A, 2006).

Eine Zellschädigung nach einem ischämischen Intervall tritt in der frühen Phase der Reperfusion auf. Ames et al (Ames A, 1968) beschrieben bereits vor mehr als 40 Jahren einen gebietsweisen Verschluss postischämisch veränderter Kapillaren im Gehirn als „No-Reflow-Phänomen“.

Im weiteren postoperativen Verlauf kann es zu einer erneuten sekundären Ischämie infolge von Hämatomdruck oder Sekundärheilung der bedeckenden Weichteile mit nachfolgender oder auch isolierter Thrombose kommen. (Kerrigan CL, 1984), (Hjortdal VE, 1994), (Angel MF, 1990), (Hauge EM, 1997)

Die Anastomose ist dabei besonders thrombosegefährdet (Shaw, 1983). Der Lappenverlust schwankt in der Literatur je nach Autor und Studie zwischen 3,8% und 10% (Jokuszies A, 2006). Laut D'Arpa (D'Arpa S, 2005) liegt die Thromboserate bei 5-30%.

Hjortdal et al (Hjortdal VE, 1994) hatten in einer Studie an Schweinen die zugrunde liegende Pathophysiologie der mikrozirkulatorischen intravaskulären Thrombose nach Lap-pentransplantationen untersucht. Nach Applikation radioaktiv markierter Thrombozyten und Fibrinogen sind diese nach venöser Stase im Vergleich zu Kontrolllappen akkumuliert. Ebenso ist der Hämatokrit signifikant angestiegen. Elektronenmikroskopisch konnte eine Extravasation von Erythrozyten gezeigt werden sowie aktivierte Thrombozyten, Fibrin und Erythrozyten in erweiterten und teilweise zerstörte Kapillaren (Hjortdal VE, 1994).

1.3 Virchow-Trias

Die Virchow-Trias beschreibt die ursächlichen Faktoren der Entstehung einer Thrombose. Der deutsche Pathologen Rudolf Virchow (1821–1902) (Virchow, 1856) hatte bereits 1856 die unerwünschte Gerinnselbildung, das heißt eine „Blutstillung am falschen Ort“ beschrieben (Henne-Bruns D, 2003). Demnach wirken auf die Entstehung der Thrombosen im Wesentlichen drei Faktoren ein:

1. Endothelschäden (Schäden an der Gefäßwand durch z.B. Entzündungen)
2. Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes
3. Veränderungen der Blutbeschaffenheit

Zwischenzeitlich sind als Ursachen der Thromboseneigung eine Vermehrung der Thrombozytenzahl, eine Steigerung der Thrombozytenfunktion, eine Zunahme der Aktivität von Gerinnungsfaktoren, eine Abnahme von Hemmkörpern der Gerinnungsfaktoren, eine verminderte fibrinolytische Aktivität, entzündliche oder degenerative Gefäßwandveränderungen, eine verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit und eine gesteigerte Blutviskosität charakterisiert worden (Henne-Bruns D, 2003).

Bei einer Kompression der Lappenvene durch ein Hämatom oder eine Schwellung kann es zur venösen Abflussstörung kommen. Damit ist bereits ein Faktor der Virchow-Trias zur Entstehung einer Thrombose erfüllt. (Abb. 1)

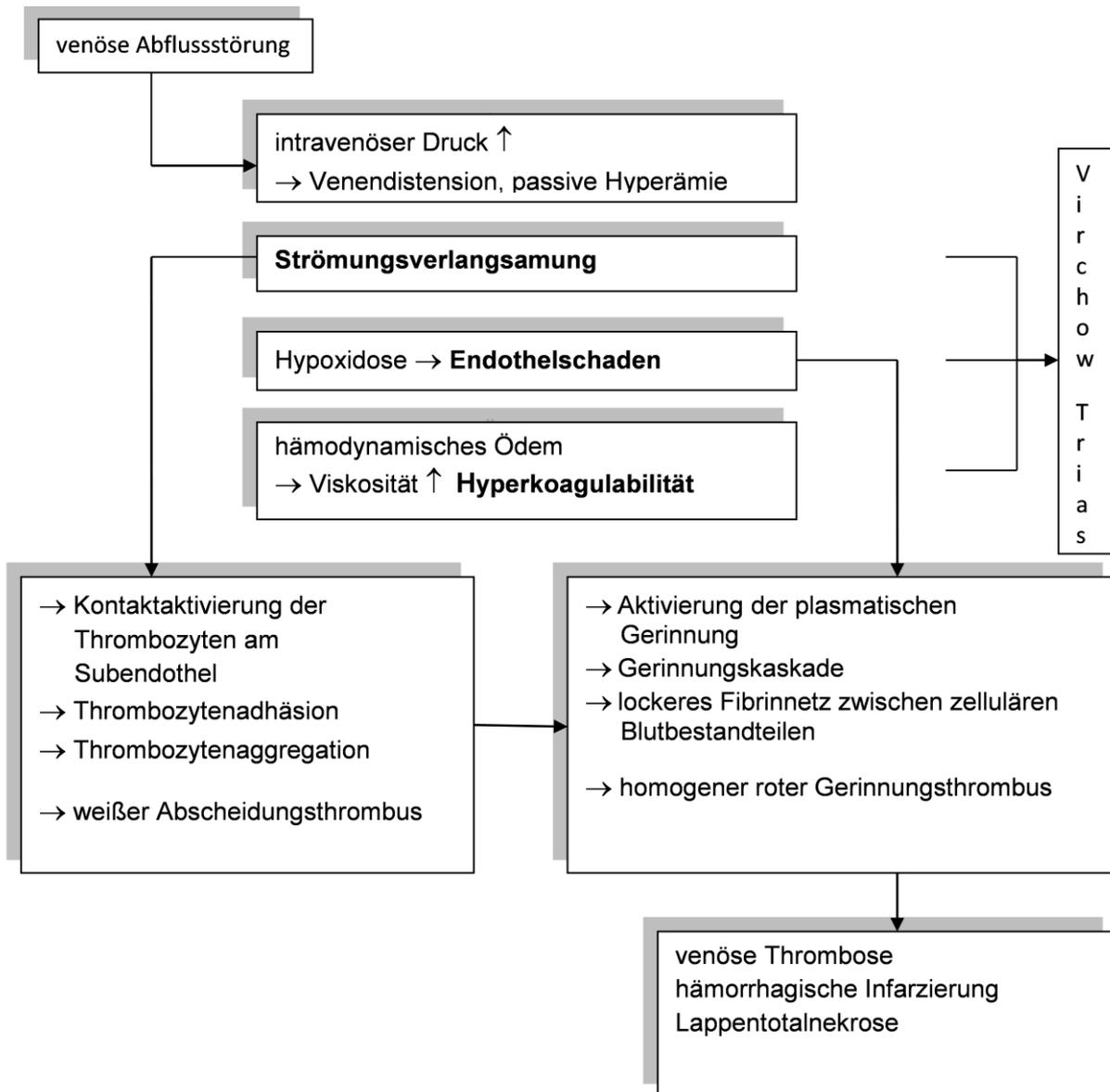


Abbildung 1: Thromboseentstehung

1.4 Nicht-medikamentöse Reduzierung der postoperativen Komplikationen

Minimiert werden kann das Risiko von Lappen(teil-)nekrosen durch Optimierung der Operationstechnik, bei der Manipulationen wie Zerren oder Drehen am Gefäßstiel vermieden werden, sowie ein unversehrtes Endothel des Empfängergefäßes und die verminderte Dauer der Ischämiezeit (Jokuszies A, 2006).

1.5 Medikamentöse Einflussnahme auf postoperative Komplikationen

Medikamentöse Einflussnahme auf Rheologie (Li D, 1997) und Vasomotorik (Frick A, 1999) reduziert ebenfalls die Gefahr der Lappen(teil-)nekrose.

1.5.1 Heparin

Heparin ist ein gerinnungshemmendes Medikament.

So hatte bereits eine Studie von Kirschner et al. (Kirschner RE, 1999) mit Sprague-Dawley-Ratten ergeben, dass die lokale Applikation von Heparin direkt in freie Transplantate nach sekundärer venöser Ischämie eine signifikant höhere Überlebensrate der Lappentransplantate bewirkt hatte. Die Autoren verglichen dabei eine unbehandelte Kontrollgruppe und eine Gruppe von Tieren, die Heparin systemisch appliziert bekommen hatten.

1.5.2 Prostazykline

Mittlerweile sind neuere Pharmaka isoliert worden, die die Blutplättchenaktivierung isoliert hemmen können und eine Gefäßerweiterung bewirken, die Prostazykline.

In einer Untersuchung von Frick et al (Frick A, 1999) wurde im Tiermodell die Wirkung der langwirksamen Prostazykline Iloprost und Cicaprost auf das Transplantatüberleben untersucht. Diese Prostazykline führten zu einem effektiven Schutz vor dieser fatalen Blutgerinnselbildung.

1.5.3 Rekombinanter Gewebefibrinolyse (rtPA, ein Fibrinolytikum)

Fibrinolytika vermögen bereits ausgebildete Blutgerinnsel aufzulösen und Gefäße zu rekanalisieren. Besondere Derivate (rtPA) wiederum entfalten ihre Wirkung nur in bereits vorhandenen Gerinnseln. (Karow T, 2006)

Aktivierung der Fibrinolyse (Estler C-J, 2007)

Ein Fibrinnetzwerk bildet eine neue Oberfläche, die selbst zur Initiierung der eigenen Proteolyse beiträgt. Von Endothelzellen produziertes tPA, dessen Freisetzung u.a. durch vasoaktive Substanzen wie den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Adrenalin, Desmopressinacetat oder Thrombin induziert werden kann, bindet zusammen mit Plasminogen an Fibrin. Der entstehende Multikomponenten-Enzymkomplex (tPA-Enzym, Fibrin=Cofaktor, Plasminogen=Substrat) führt zur effektiven Plasminbildung, die auf den Wundheilungsort beschränkt bleibt. Über einen proteolytischen Nebenweg kann am Endothel generiertes Kallikrein auch zur intrinsischen Bildung von Plasmin beitragen.

Die Wirkung auf bedrohte freie mikrovaskuläre Transplantate ist bislang noch nicht voll-

ständig geklärt. Gentechnisch hergestelltes rtPA (Alteplase, Actilyse®) fördert als Plasminogenaktivator die Fibrinolyse (Karow T, 2006).

Rinker hatte in einer klinischen Studie (Rinker BD, 2007) zwischen 2000 und 2005 untersucht, ob die isolierte Perfusion von rtPA freien Lappen vor dem Verlust eher retten konnte als die alleinige chirurgische Revision der Anastomose. Dabei wurden in der mit rtPA behandelten Gruppe (Thrombektomie plus rtPA-Gabe) 67% und in der Nicht-rtPA-Gruppe (nur Thrombektomie) 29% der Lappen nach einer vorangegangenen Thrombose gerettet. Das Ergebnis war allerdings statistisch nicht signifikant. Eine höhere Dosis rtPA hatte die Lappenüberlebensrate nicht erhöht.

2 Fragestellung und Ziel der Studie

Intraoperative primäre Ischämie bei Weichteilgewebe kann nach der Verpflanzung (Transposition) zu Reperfusionsschäden durch eine gestörte Homöostase der mikrovaskulären Perfusion führen (Jokuszies A, 2006).

Thrombosierung oder Vasospasmen der zu- oder abführenden anastomosierten Blutgefäße als sekundäre Ischämie/Stase im späteren postoperativen Verlauf können zu deren Verschluss führen und das Transplantat dadurch erneut vital bedrohen.

Die komplexen Mechanismen der Störung der Durchblutung in den kleinen und kleinsten Blutgefäßen der Transplantate ist jedoch bisher nur ansatzweise bekannt (Frick A, 1999).

Daher muss zusätzlich zur Verbesserung der Operationstechnik auch eine Optimierung der medikamentösen Behandlung erfolgen. Obwohl bisher viele experimentelle und klinische Studien durchgeführt wurden, gibt es noch keinen Konsens bezüglich der Effektivität und der optimalen Dosierung verschiedener pharmakologischer Substanzen für die Prävention und Behandlung von Thrombosen in der Mikrochirurgie.

Einige gerinnungshemmende Medikamente wie Heparin haben schwerwiegende Nebenwirkungen, wie eine Verschlechterung der Durchblutung durch Kompression als Folge einer Blutung in die Umgebung von blutzuführenden Gefäßen (Shaw, 1983).

Bisherige Indikationsgebiete von high-dose-Heparin sind Behandlungen venöser Thromben und Lungenembolien, instabiler Angina pectoris, akuter Myokardinfarkte und die Prophylaxe von Rethrombosen nach Fibrinolyse, Prophylaxe von Thrombosen bei Hämofiltration, Hämodialyse, extrakorporaler Zirkulation. Das Indikationsgebiet von low-dose-Heparin ist die (postoperative) Thromboseprophylaxe (Karow T, 2006).

Die Prostazykline Iloprost und Cicaprost erwiesen sich bereits bei Frick et al (Frick A, 1999) als effektiven Schutz vor dieser fatalen Blutgerinnselbildung.

Die Auflösung bereits gebildeter Blutgerinnsel und die Rekanalisation von Gefäßen gelingen hingegen mit Fibrinolytika. Gentechnologisch hergestelltes rtPA (engl.: recombinant tissue plasminogen activator) fördert als Plasminogenaktivator die Fibrinolyse.

Die bisherigen Indikationen für eine rtPA-Therapie sind die Therapie des akuten Myokardinfarkts, der Phlebothrombose, der Lungenembolie, der pAVK und des Schlaganfalls (Karow T, 2006).

In einer früheren klinischen Studie (Rinker BD, 2007) wurden Heparin und rtPA bereits nach Auftreten postoperativer Thrombosen eingesetzt und durch rtPA, wenn auch nicht signifikant, die Überlebenschancen der Gewebelappen erhöht.

In der vorliegenden experimentellen Untersuchung wurde der pharmakologische Einfluss sowohl von Heparin als auch des Fibrinolytikums rtPA auf das Überleben frei transplan-
tierter Lappenplastiken nach sekundärer venöser Stase untersucht.

3 Material und Methoden

Die experimentellen Untersuchungen wurden am Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Pohl), Klinikum Großhadern, in der Zeit von Dezember 2005 bis November 2007 durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 210 bis 520 Gramm ausgewählt. Diese wurden bezogen von der Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland. Die Tiere waren unvorbehandelt und infektfrei mit einer mindestens einwöchigen Akklimatisierungszeit.

3.2 Versuchsablauf

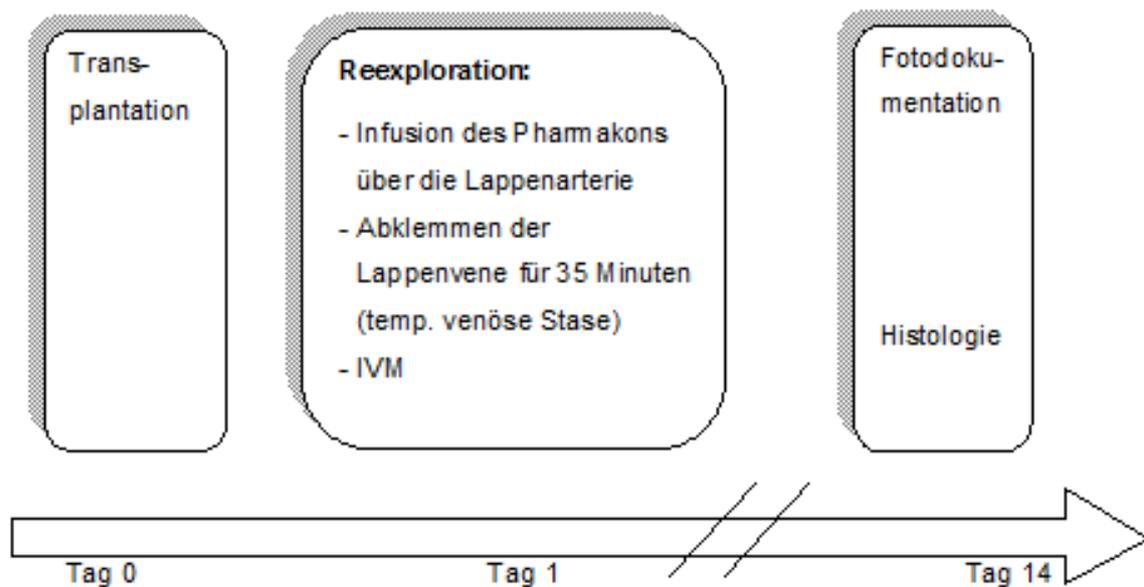


Abbildung 2: Versuchsablauf

3.3 Durchführung der Transplantation

3.3.1 Vorbereitungen des Versuchstieres

Zur Durchführung der freien, mikrovaskulären Transplantation wurden die Tiere zur Narkose in einen Ätherrausch versetzt und intraperitoneal eine Initialdosis von 1,2 ml bestehend aus 0,05 ml Fentanyl (Fa. Janssen, Neuss), 1,07 ml Midazolamhydrochlorid

(Midazolam-ratiopharm® 5mg/5ml, Fa. Ratiopharm GmbH, Ulm) und 0,08 ml Medetomidinhydrochlorid (Dormitor®, Fa. Pfizer GmbH, Karlsruhe) appliziert. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe wurde jedes Tier auf einem beheizten Operationstisch gelagert, in der rechten Leistengegend rasiert und mit 2 Liter O₂/Minute beatmet. Die Narkose wurde dann im 30-minütigem Abstand bis zum Ende der Transplantation mit je einem Bolus von 0,5 ml des Narkose-Gemischs fortgeführt.

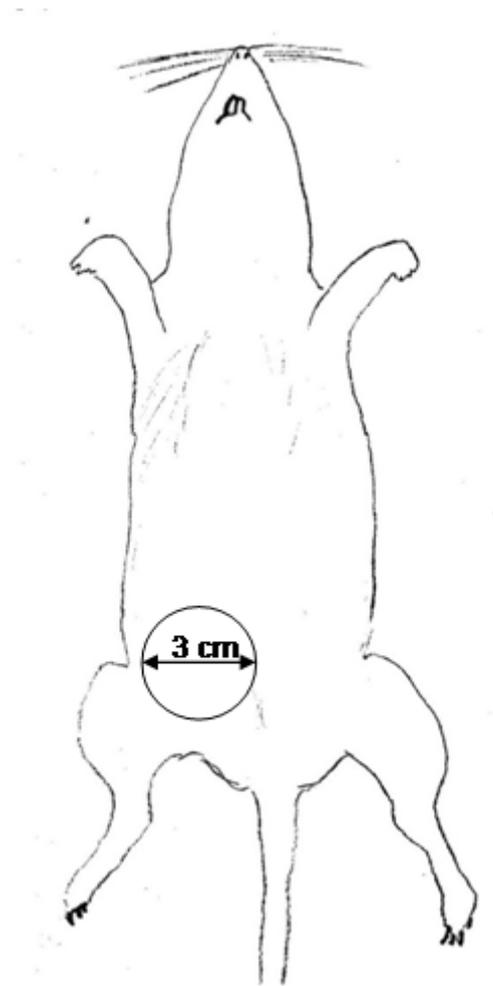


Abbildung 3: Lappenentnahmestelle in der Leiste beim Versuchstier

3.3.2 Leistenlappenhebung

In der rechten Leiste wurde ein mit 3 cm im Durchmesser großer adipokutaner Lappen umschnitten (Abb. 3). Die weiteren Schritte der Operation wurden unter einem Operationsmikroskops OPMI 6-F (Fa. Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Dabei wurden die epigastri-schen Gefäße präpariert. Die proximalen und distalen Femoralisgefäßsegmente am Abgang der epigastri-schen Gefäße wurden dargestellt. Der Gefäßstiel wurde bis unterhalb

des Abgangs der tiefen Femoralgefäße isoliert. Distal davon wurden Arteria und Vena femoralis superficialis ligiert und durchtrennt. Anschließend wurde der Gefäßstiel mit Heparinlösung angespült und das Transplantat mit gekühlter Vollelektrolytlösung befeuchtet. Die Transplantatentnahmestelle wurde mit einer fortlaufenden Naht (Resolon Nadel DS 16, Fa. Resorba, Nürnberg) verschlossen.

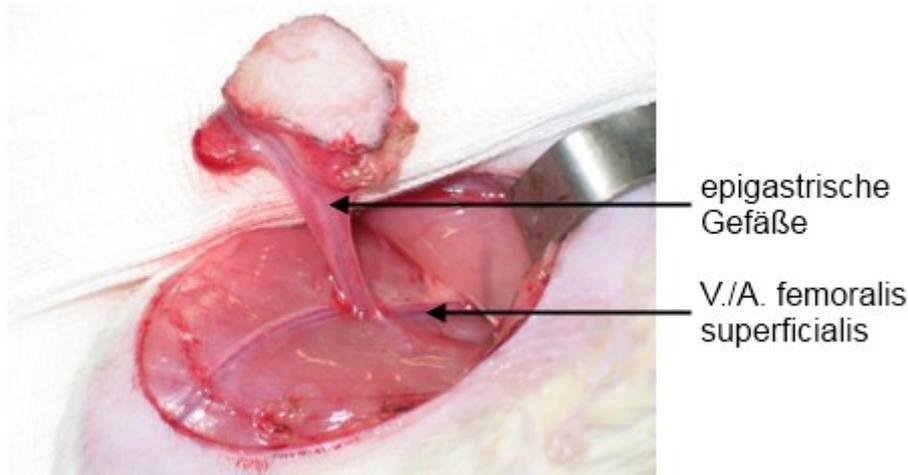


Abbildung 4: Lappenhebung in der Leiste beim Testtier

3.3.3 Transplantation des freien Leistenlappens an den Hals

Am Hals wurde ein von ca. 4 cm im Durchmesser großer Bereich rasiert und median ein im Durchmesser von 3 cm großer adipokutaner Lappen umschnitten.

Die weiteren Schritte erfolgten unter des Operationsmikroskops (OPMI 6-F, Fa. Zeiss, Oberkochen). Die linke Arteria carotis communis und die linke Vena jugularis wurden mikrochirurgisch dargestellt. Die linke Arteria carotis communis wurde proximal mit einer Bulldogklemme nach De Bakey-Hess (BH 30, Fa. Aesculap AG, Tuttlingen) abgeklemmt, distal mit einem Polygalactinfaden (Vicryl® Stärke 4-0, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) ligiert und dazwischen durchtrennt. Das proximale Ende der Arterie wurde daraufhin mit dem Gefäßstiel der Arteria femoralis superficialis des freien Lappens mit Einzelknopfnähten End zu End anastomosiert. Hierzu wurde ein nicht-resorbierbarer Faden (Ethilon®, Stärke 10-0 BV-4, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) verwendet. Die linke Vena jugularis wurde proximal mit einer Bulldogklemme nach De Bakey-Hess (BH 30, Fa. Aesculap AG, Tuttlingen) abgeklemmt, distal ligiert und dazwischen durchtrennt. Das proximale Ende der Vene wurde mit dem Gefäßstiel der Vena femoralis superficialis des freien Lappens mit Einzelknopfnähten anastomosiert. Dabei wurde ein nicht-resorbierbarer Ethilon®-

Faden der Stärke 10-0 BV-4 (Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) verwendet. Im Anschluss wurden die Mikrogefäßklemmen an Arterie und Vene entfernt. Der arterielle Zufluss und der venöse Abfluss wurden durch einen Ausstreichtest (Acland, 1972), (Hayhurst JW, 1975) zwischen zwei Mikropinzetten unter dem Operationsmikroskops überprüft. Dabei wurde die Gefäßwand proximal der Anastomose mit den Branchen der einen Mikropinzette komprimiert, womit der Blutfluss unterbrochen war. Mit der zweiten Mikropinzette wurde die Blutsäule im Gefäß über die Anastomose ausgestrichen, so dass der Anastomosenbereich blutleer war. Bei intaktem Gefäßfluss musste sich das Gefäß nach Entfernung derjenigen Pinzette, die proximal der Blutflussrichtung war, unmittelbar füllen. Die Lappenränder wurden durch Einzelknopfnähte (Prolene®, Fadenstärke 3-0, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) an das Halsgewebe adaptiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die neu anastomosierten Gefäße weder torquiert noch übermäßig abgedrückt wurden, um technisch bedingte Ischämien zu vermeiden.

Nur Tiere mit intakten Anastomosen wurden einbezogen.

Die Narkose wurde mit einem Antidot von mindestens 2,0 ml bestehend aus 0,124 ml Atipamezol Hydrochlorid (Antisedan®, Fa. Pfizer GmbH, Karlsruhe), 1,63 ml Flumazenil (Anexate®, Fa. Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) und 0,24 ml Naloxonhydrochlorid-Dihydrat (Naloxon Inresa®, Fa. Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) beendet. Bei größeren Tieren oder sehr tiefer Narkose wurde das Volumen auf 3 ml erhöht.

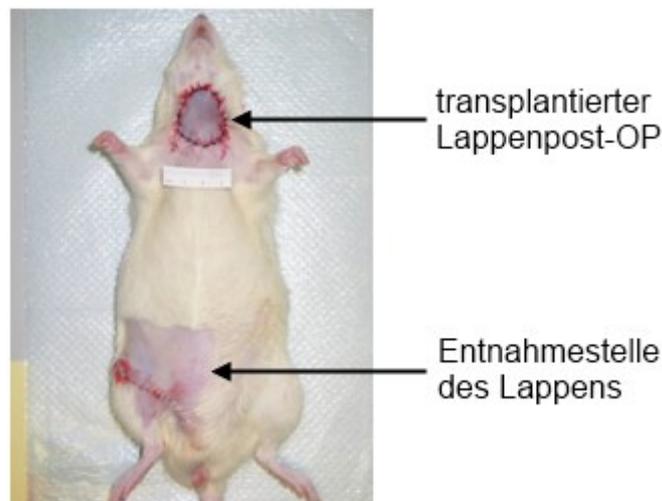


Abbildung 5: Versuchstier nach Abschluss der Transplantation

3.4 Durchführung des Versuchs

3.4.1 Substanzen für die Intravitalmikroskopie

Um beim Versuchstier in vivo die Perfusion der Gefäße im transplantierten Lappen beurteilen zu können, wurde ihm Fluorescein-isothiocyanate (FITC-Dextran MG 50.000, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 50 mg/kg Körpergewicht) und speziell angefärbte Spender-Thrombozyten injiziert. Plasma beziehungsweise Spenderthrombozyten lassen sich dann bei einer bestimmten Wellenlänge (450 nm) intravital mikroskopisch darstellen.

3.4.1.1 Plasma-Farbstoff

- Fluorescein isothiocyanate (=FITC-Dextran) ist ein fluoreszierender Farbstoff.

Aufbereitung von FITC:

1 g FITC-Dextran (Firma Sigma-Aldrich, St Louis, USA) (MW 50.000) wird zusammen mit 20 ml 0,9% NaCl und einem Rührfisch in ein Becherglas gefüllt. Dabei wird das Becherglas mit Alufolie umwickelt und 30 Minuten auf einem Magnetrührer gerührt. Unter Flow wird FITC-Dextran in 20 ml-Spritzen aufgezogen, über Minisat-Filter steril in Erlenmeyerkolben filtriert. Aliquots werden anschließend in 1 ml-Spritzen aufgezogen und bei -20 °C gelagert.

3.4.1.2 Substanzen für Test-Thrombozyten

Für die Markierung der Test-Thrombozyten (Massberg S, 1998) für die Intravitalmikroskopie werden folgende Substanzen benötigt:

- Alsevers-Puffer (isotonische Salzlösung): Pufferlösung
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline): Pufferlösung
- PGE1 (Prostaglandin E1): thrombozytenaggregationshemmend

Aufbereitung von PGE1:

1 mg Prostaglandin E1 (Firma Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) wurde in 50 ml NaCl 0,9% gelöst.

Lagerung bei -20 °C

- Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE) (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ein Fluoreszenz-Farbstoff der membrangängig ist. Er bindet an zytoplas-

matische Proteine und beeinträchtigt die Zellfunktion nicht. Von intrazellulären Esterasen wird er durch Abspaltung zweier Azetatgruppen in das fluoreszierende Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt, das weniger membrangängig ist.

Dieser Farbstoff dient der Anfärbung der Thrombozyten.

Aufbereitung von CFDA-SE:

25 µg CFDA-SE (=50 mM) (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in 897 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (ist membranstabilisierend). Lagerung bei -20°C.

3.4.2 Gewinnung und Aufbereitung der Test-Thrombozyten

3.4.2.1 Gewinnung von Spenderblut

Die Thrombozyten, die für die Beurteilung der makro- und mikrovaskulären Perfusion im transplantierten Lappen benötigt wurden, stammten von einem Spendertier.

Als Spendertiere dienten männliche Sprague Dawley-Ratten. Alle Spendertiere hatten ein Gewicht zwischen 210 bis 520 Gramm. Bezogen wurden sie wie auch die Testtiere von der Firma Charles River, Sulzberg, Deutschland.

Das Spendertier wurde in einen Ätherrausch versetzt, um Blut mittels Herzpunktion zu gewinnen. Die Punktionsspritze wurde vorab mit Heparin benetzt. Als Kanülengröße wurden 19G gewählt. Je nach Körpergröße konnten bis zu 8 ml Blut punktiert werden. Das Spendertier wurde in der nachfolgenden Äthernarkose euthanasiert.

3.4.2.2 Aufbereitung der Thrombozyten des Spendertiers

2 mit Heparin benetzte Zentrifugenröhrchen wurden je mit 400 µl Alsevers-Puffer, 30 µl PGE1, 1600 µl Vollblut und 1000 µl DPBS bestückt. Bei 900 Umdrehungen/Minute wurden die Röhrchen 10 Minuten lang zentrifugiert. Dabei durfte die Zentrifuge nach Ablauf der Zeit nicht abrupt abbremsen, da sich sonst die Schichten wieder vermischt hätten. Nach Beendigung wurde der Überstand, welcher aus plättchenreichem Plasma bestand, vorsichtig unter Belassung des Buffy coats abpipettiert und in 2 weitere Zentrifugenröhrchen verteilt. Den Röhrchen wurden je 3000 µl DPBS, 800 µl Alsevers-Puffer, 100 µl PGE1 und 6 µl CFDA-SE zugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen bei 3000 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Über-

stand wurde dekantiert und verworfen. Am Röhrchenboden befanden sich schließlich die angefärbten Thrombozyten, die mit jeweils 300 µl DPBS resuspendiert wurden. Bei dieser Suspension wie auch aus dem ursprünglichen Vollblut des Spendertiers wurden Thrombozytenmessungen im Coulter-Counter durchgeführt um potentielle Fehler anhand einer zu geringen Thrombozytenzahl aufzudecken. (Massberg S, 1998)

3.4.3 Trüfsubstanzen

3.4.3.1 Tutofusin

- Kontrollsubstanz für Gruppe B
- Vollelektrolytlösung bestehend aus Na, Ca, Cl, K und Mg

3.4.3.2 Heparin

- Prüfpharmakon für Gruppe C
- unfraktioniertes Heparin wirkt gerinnungshemmend,
- es dient der Komplexbildung mit Antithrombin III (AT-III). Dadurch wird die inhibierende Wirkung von AT-III um den Faktor 1000 beschleunigt.
- Thrombin, Faktor Xa, XIa, XIIa und Kallikrein werden inaktiviert,
- die Lipoproteinlipase wird aktiviert.

3.4.3.3 rtPA

- Prüfsubstanz für Gruppe D
- TPA ist eine nahezu in allen humanen Geweben vorhandene Substanz, die als Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tissue-type - PA, = tPA) bezeichnet wird
- RtPA ist ein gentechnisch hergestellter physiologischer Plasminogenaktivator.
- RtPA (Actilyse®) (Fa. Boehringer, Ingelheim): rekombinanter tissue type plasminogen activator.
- Es ist fibrinselektiv, das heißt, es aktiviert vorwiegend das an Fibrin gebundene Plasminogen. In Gegenwart von Fibrin entwickelt es ein Vielfaches seiner sonstigen Aktivität und wirkt somit selektiv an Thromben.
- Es hemmt nicht die Blutgerinnung.
- Halbwertszeit von rtPA beträgt etwa 4,4 min.
- Es löst keine Antikörperbildung aus, induziert somit keine allergischen Reaktionen..

3.4.4 Versuchsgruppen

Gruppe	A	B	C	D
Anzahl der Tiere	5	8	9	10
Pharmakon	keine	Tutofusin	Heparin	rtPA

Tabelle 1: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

3.5 Vorbereitung des Testtiers

24 Stunden nach der erfolgreichen Transplantation des Leistenlappens an den Hals wurde das Tier zur Narkose in einen Ätherrausch versetzt und intraperitoneal eine Initialdosis von 1,2 ml bestehend aus einem Gemisch aus 0,05 ml Fentanyl (Fa. Janssen, Neuss), 1,07 ml Midazolamhydrochlorid (Midazolam-ratiopharm® 5mg/5ml, Fa. Ratiopharm GmbH, Ulm) und 0,08 ml Medetomidinhydrochlorid (Dormitor®, Fa. Pfizer GmbH, Karlsruhe) appliziert. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe wurde das Tier auf einem beheizten Operationstisch gelagert, in der linken Leistengegend rasiert und mit 2 Liter O₂/min beatmet. Anschließend wurde die noch verbliebenen Haare der linken Leiste mit Enthaarungscreme Pilca (Fa. GlaxoSmithKline, München) entfernt. Die linke Leiste hat bei der nachfolgenden Intravitalmikroskopie als Kontrollareal gedient. Die Narkose wurde dann im 30-minütigen Abstand bis zum Ende der Operation mit jeweils 0,5 ml des Narkose-Gemischs aufrechterhalten.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde der Lappen aus seinem Bett herausgelöst und die Stielgefäße exponiert. Dabei wurden Tiere mit einer thrombosierte Arterie oder Vene an der Anastomosenstelle vom weiteren Versuch ausgeschlossen. Im Falle durchgängiger Gefäße wurde im distalen Stumpf der Arteria femoralis superficialis des Lappens nach Abklemmung und Lösen der Ligatur ein Katheter mit einem Durchmesser von 0,28 mm eingelegt. Dieser Katheter diente zur späteren Infusion der Pharmaka.

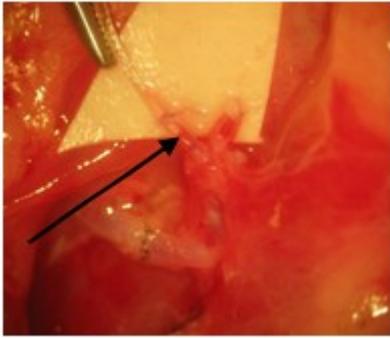


Abbildung 6: Katheter in Arterie eingeführt

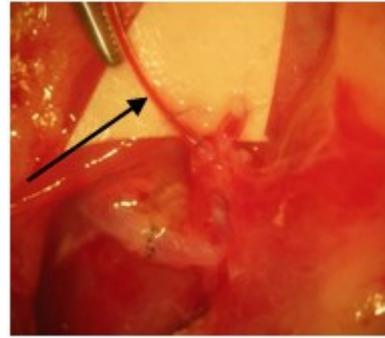


Abbildung 7: Test auf positiven Rückfluss in den Katheter

An der rechten Leiste wurde die Naht wieder geöffnet, die Ligatur an der Vena femoralis superficialis entfernt und ein Katheter von 0,4 mm Durchmesser eingelegt. Dieser Katheter diente zur Aufrechterhaltung der Narkose und der Applikation der Kontrastmittel für die Intravitalmikroskopie.

3.5.1 Infusion der Versuchslösungen beim Versuchstier

Die zu untersuchenden Tiere wurden mittels Randomisierung durch tabellarisierte Zufallszahlen einer Testgruppe zugeordnet. (Linder A, 1959). Über den Katheter im distalen Stumpf der Arteria femoralis superficialis im transplantierten Lappen wurde entweder keine Infusion (Gruppe A) oder die Pharmaka (Gruppe B-D) mit Dauerinfusionspumpe (Perfusor® FM der Fa. Braun, Melsungen) infundiert (Abb. 8). Das Infusionsvolumen wurde auf 1 ml (über 10 Min. i.a.) begrenzt.

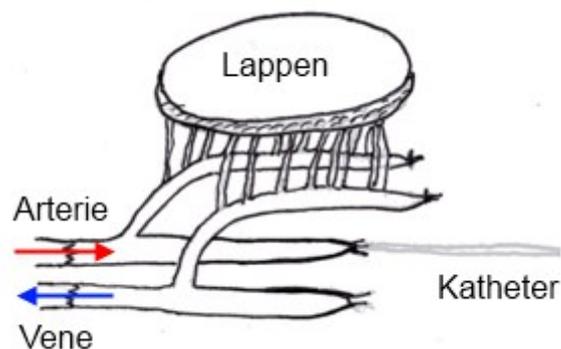


Abbildung 8: Infusion in das Transplantat

3.5.1.1 Dosierung von Tutofusin

Bei Versuchstieren der Gruppe B wurde 1 ml Tutofusin über 10 Minuten infundiert.

3.5.1.2 Dosierung von Heparin

Bei Versuchstieren der Gruppe C wurden 100IU/kg KG in 1 ml Ringerlösung über 10 Minuten infundiert.

3.5.1.3 Dosierung von rtPA

Die Maximal-Dosierung von rtPA beim Menschen bei akutem Myokardinfarkt oder akuter Lungenembolie sollte 100 mg nicht überschreiten. Bei akutem ischämischem Schlaganfall liegt die empfohlene Maximaldosierung bei 90 mg. Dabei teilt sich die Dosis jeweils auf einen initialen Bolus und anschließender Infusion über einen definierten Zeitraum auf. Somit liegt die durchschnittliche Perfusor®-Dosierung bei 1,5 mg/kg KG. In der Literatur sind Dosierungen von 3 mg/kg KG (Umemura K, 2008), 5 mg/kg KG (Alonso de Lecinana M, 2006) (Andersen M, 1999), 6 mg/kg KG (Rasmussen RS, 2003), 9 mg/kg KG (Burggraf D, 2010) und 10 mg/kg KG (Neumann-Haefelin C, 2002) (Niessen F, 2002) (Fagan SC, 2003) (Röttger C, 2005) (Yang Y, 2003) (Romanos E, 2007) (Haelewyn B, 2010) bei der Anwendung von rtPA bei Schlaganfällen bei Ratten beschrieben. Wir haben die Dosierung von rtPA von 2 mg/kg KG in unserem Experiment gewählt.

Bei Versuchstieren der Gruppe D wurden 2 mg/kg KG in 1 ml Ringerlösung über 10 Minuten intraarteriell appliziert.

3.5.2 Abklemmen der Transplantatvene

Anschließend wurde durch Abklemmen der Lappenvene für 35 Minuten eine temporäre venöse Stase experimentell erzeugt (Abb. 9).

Eigene Vorexperimente zeigten einen positiven Zusammenhang von Infusionsvolumen und Lappenüberleben bzw. Verlängerung der Toleranzzeit einer venösen Stase. Die Dauer der artifiziell gesetzten venösen Stase wurde von uns experimentell ermittelt und mit 35 Minuten gewählt. Dies führte in der unbehandelten Kontrollgruppe stets zum Lappenverlust (Abb. 10-13).

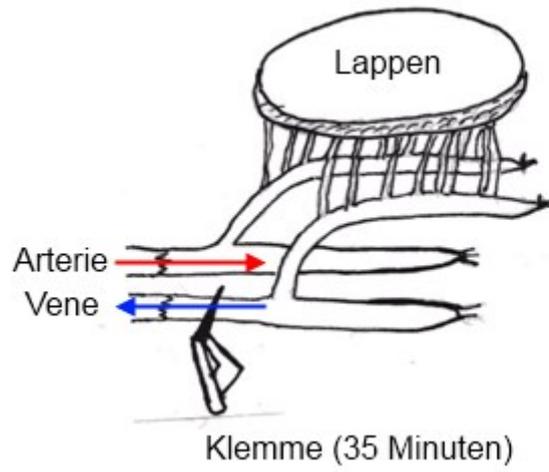


Abbildung 9: Abklemmen der Transplantatvene

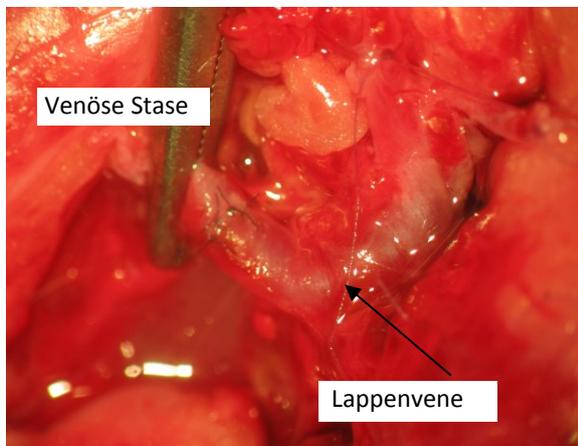


Abbildung 10: Abgeklemmte Lappenvene

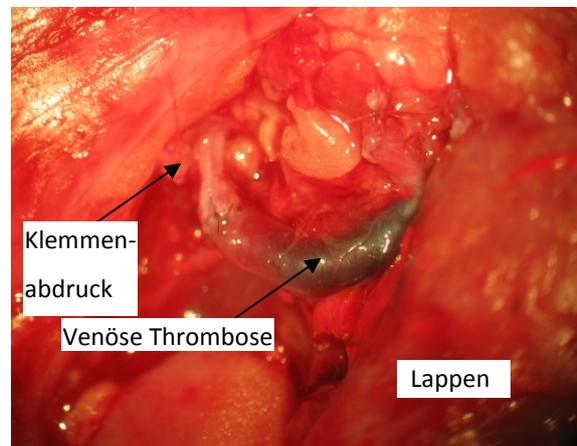


Abbildung 11: Venöse Thrombose



Abbildung 12: Lappen post-OP



Abbildung 13: Nekrotischer Lappen 5. post-OP-Tag

3.5.3 Intravitalmikroskopie

Zur Intravitalmikroskopie wurde ein modifiziertes Auflichtmikroskop (Firma Leitz GmbH, Wetzlar) und ein Fluoreszenz-Phasenkontrast-Objektiv Plan-Neo FLUAR (Fa. Zeiss 10x/0,3, Oberkochen) verwendet. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 10-fach Objektiv der Firma Leitz GmbH, Wetzlar, verwendet.

3.5.3.1 Vorbereitungen

Die linke Leiste des Versuchstiers wurde rasiert und anschließend noch mit einer Enthaarungscreme (Pilca, Fa. GlaxoSmithKline, München), unter Einbehaltung einer Einwirkungszeit von 10 Minuten, behandelt. Ebenso wurde der transplantierte Lappen von Resthaaren mittels Enthaarungscreme befreit. Verbleibende Haare bzw. Haarbälge stören das Mikroskopieren, da sie eine Eigenfluoreszenz aussenden wie der verwendete Farbstoff. Das Tier wurde in einer eigens dafür gebauten Vorrichtung unter dem Mikroskop gelagert. Es wurde mit Sauerstoff (2 Liter/Minute) beatmet. Körperbereiche, die für das Mikroskopieren nicht relevant waren, wurden mit einer Alufolie bedeckt, so dass das Tier nicht auskühlen konnte.

3.5.3.2 Mikroskopie der gefärbten Thrombozyten

Über den Katheter in der Vena femoralis superficialis wurden die vom Spendertier gewonnenen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE angefärbten Thrombozyten injiziert. Nach einer durchschnittlichen Wartezeit von mindestens 10 Minuten nach der In-

jektion wurde das Mikroskopieren im Peripheriebereich der linken Leiste begonnen. Dabei wurden 5 Gesichtsfelder in der Peripherie und 5 Gesichtsfelder im Zentrum untersucht und jeweils eine Minute auf eine Videokassette aufgezeichnet. Im Anschluss daran wurden jeweils 5 Gesichtsfelder der Peripherie und 5 Gesichtsfelder des Zentrums des Lappens für jeweils 1 Minute auf Videoband aufgezeichnet.

3.5.3.3 Mikroskopie des angefärbten Plasmas

Über den Katheter in der Vena femoralis superficialis wurde nach Beendigung der Thrombozytenmessung 0,2 ml FITC-Dextran injiziert. Hiermit ließen sich die durchbluteten Kapillaren sichtbar machen. Nach einer durchschnittlichen Wartezeit von mindestens 10 Minuten nach der Injektion wurde das Mikroskopieren im Peripheriebereich der linken Leiste begonnen. Dabei wurden 5 Gesichtsfelder eingestellt und jeweils 30 Sekunden auf eine Videokassette aufgezeichnet. Mit dem mittleren Bereich der linken Leiste wurde ebenso verfahren. Im Anschluss daran wurden jeweils 5 Gesichtsfelder der Peripherie und 5 Gesichtsfelder des Zentrums des Lappens für jeweils 30 Sekunden auf Band aufgezeichnet.

3.5.3.4 Nacharbeiten

Nach Beendigung der Mikroskopie wurde das Tier wieder auf dem beheizbaren OP-Tisch gelagert und mit Sauerstoff (2 Liter/Minute) beatmet. Nach Legen eines intraperitonealen Zugangs wurden dem Tier je nach Körpergröße zum Volumenausgleich 8 – 15 ml Tutofusin intraperitoneal appliziert. Der Katheter in der rechten Leiste wurde abgeschnitten und mit einem Knoten versehen. Mit einer fortlaufenden Naht und einem Nahtmaterial Prolene 3-0 (Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) erfolgte dann der Hautverschluss der rechten Leiste. Die Narkose wurde mit einem Antidot von mindestens 2,0 ml bestehend aus 0,124 ml Atipamezol-Hydrochlorid (Antisedan®, Pfizer GmbH, Karlsruhe), 1,63 ml Flumazenil (Anexate®, Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) und 0,24 ml Naloxonhydrochlorid-Dihydrat (Naloxon Inresa®, Fa. Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) beendet. Bei größeren Tieren oder sehr tiefer Narkose wurde diese Menge auf 3,0 ml erhöht. Nach dem Erwachen wurde das Tier für weitere 20 Minuten durch eine Infrarotlampe gewärmt.

3.5.4 Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen

Die Videoaufzeichnungen der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden nach Beendigung der Versuche offline ausgewertet. Dadurch konnte die Versuchsdauer und

die Belastung für die Tiere auf ein erforderliches Minimum reduziert werden. Die Auswertung erfolgte durch das Computerprogramm Cap-Image (Dr. Zeintl, Heidelberg).

3.5.4.1 Bestimmung der Thrombozytenanzahl

Die jeweils 5 Gesichtsfelder aus der Peripherie und des Zentrums der linken Leiste des Testtiers mit den angefärbten Thrombozyten, sowie die jeweils 5 Gesichtsfelder aus der Peripherie und des Zentrums des transplantierten Lappens mit den angefärbten Thrombozyten wurden gesichtet. Pro Gesichtsfeld war eine Länge von einer Minute aufgezeichnet, die in zwei Schritten zu jeweils 30 Sekunden ausgewertet wurden. Alle die Kapillaren durchfließenden Thrombozyten wurden gezählt. Sind Thrombozyten am Endothel haften geblieben, so sind diese als anhaftende Thrombozyten gesondert gezählt worden. Dabei wurde nicht unterschieden, ob sie während der Auswertung des Gesichtsfeldes oder bereits zu Beginn der Auswertung des Gesichtsfeldes am Endothel haften geblieben sind. Einige Gesichtsfelder waren teilweise ödematös oder auch mit einem Fibrinfilmm belegt, so dass die Auswertung erschwert war. Die Auswertbarkeit des Gesichtsfeldes wurde durch eine Skala von 0 bis 4 bewertet.

3.5.4.2 Bestimmung der funktionellen Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte ist definiert als die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren (cm/cm^2) pro analysiertes Gesichtsfeld. Sie wird in cm/cm^2 bestimmt. Dabei werden ausschließlich durchblutete Kapillaren erfasst, die zur Oxigenierung des Hautweichgewebes beitragen.

Auch hier wurden nacheinander die aufgezeichneten Gesichtsfelder aus der Peripherie und des Zentrums der linken Leiste des Testtiers mit dem angefärbten Plasma, sowie die jeweils 5 Gesichtsfelder aus der Peripherie und des Zentrums des transplantierten Lappens mit dem angefärbten Plasma ausgewertet. Pro Gesichtsfeld war eine Länge von 30 Sekunden aufgezeichnet. Hier wurde das Band an einer Stelle ausgewertet, die ein optimal scharfes Bild der Kapillaren zeigte. Mit Hilfe des Computerprogrammes Cap-Image (Dr. Zeintl, Heidelberg) wurden die durchbluteten Kapillaren markiert und die funktionelle Kapillardichte als Mittelwert von fünf ausgewerteten Beobachtungsfeldern und einer Gesamtfläche von 69 mm^2 bestimmt.

Durch partiellen Fibrinbelag oder ödematöser Stellen (v.a. im Lappen) war es erschwert, alle Kapillaren von der Umgebung exakt abzugrenzen.

3.5.4.3 Bestimmung der Kapillardurchmesser

Der Durchmesser der Kapillaren wurde ebenfalls mit Hilfe des computergestützten Bildverarbeitungssystems am Standbild der Videoaufzeichnung bestimmt. Der Fluoreszenzmarker FITC-Dextran führte zu einer Kontrastierung des Kapillarlumens, so dass die Gefäßwand eindeutig zu bestimmen war. Durch Markierung dieser Grenzen senkrecht zum Kapillarverlauf wurde die Distanz in μm direkt am Standbild bestimmt.

3.5.5 Makroskopische Beurteilung

Jeden 2. Tag bis zu Tag 14 wurde die Lappenregion standardisiert dokumentiert. (Abb. 14,15)



Abbildung 14: Abfolge Dokumentation eines nekrotischen Lappens



Abbildung 15: Abfolge Dokumentation eines vitalen Lappens

4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Statistikprogramms SPSS (Version 15.0, SPSS GmbH, München). Angaben über die verwendeten Testverfahren finden sich im Ergebnisteil im Text, in den Tabellen und Abbildungen.

Für die statistischen Vergleiche wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt.

5 Ergebnisse

Insgesamt wurden 32 Tiere ausgewertet. Dabei wurden die funktionelle Kapillardichte, der Kapillardurchmesser, die Anzahl der angefärbten fließenden Thrombozyten pro Minute und die Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden Thrombozyten offline nach Ausarbeitung der Videoaufzeichnungen bestimmt.

Die Vitalität der Lappen wurde bis zum Tag 14 nach Transplantation durch eine makroskopische Beurteilung bewertet.

5.1 Unbehandelte Kontrollgruppen

Es wurden in unseren Versuchen zwei Kontrollgruppen etabliert: Die unbehandelte Gruppe A, deren Versuchstiere keinerlei Perfusat in den transplantierten Lappen erhalten hatten und die Gruppe B, deren Versuchstiere die Vollelektrolytlösung Tutofusin in den transplantierten Lappen vor der erzeugten sekundären Stase von 35 Minuten erhalten hatten.

Beim Vergleich der transplantierten Lappen mit der kontralateralen Leiste beider Kontrollgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der funktionellen Kapillardichte (Abb. 16).

In den Lappen der unbehandelten Kontrollgruppe A betrug die funktionelle Kapillardichte in der Peripherie $1,12 \text{ cm/cm}^2$, im Zentrum $8,34 \text{ cm/cm}^2$. In der Leistenperipherie zeigte sich eine funktionelle Kapillardichte von $168,92 \text{ cm/cm}^2$, im Leistenzentrum von $198,02 \text{ cm/cm}^2$.

Bei der Gruppe B mit Vollelektrolytlösung lag die funktionelle Kapillardichte in der Peripherie des Lappens bei $57,04 \text{ cm/cm}^2$ und im Zentrum bei $47,23 \text{ cm/cm}^2$. Die funktionelle Kapillardichte der Leistenperipherie betrug $164,66 \text{ cm/cm}^2$, des Leistenzentrum $174,21 \text{ cm/cm}^2$.

5.1.1 Funktionelle Kapillardichte

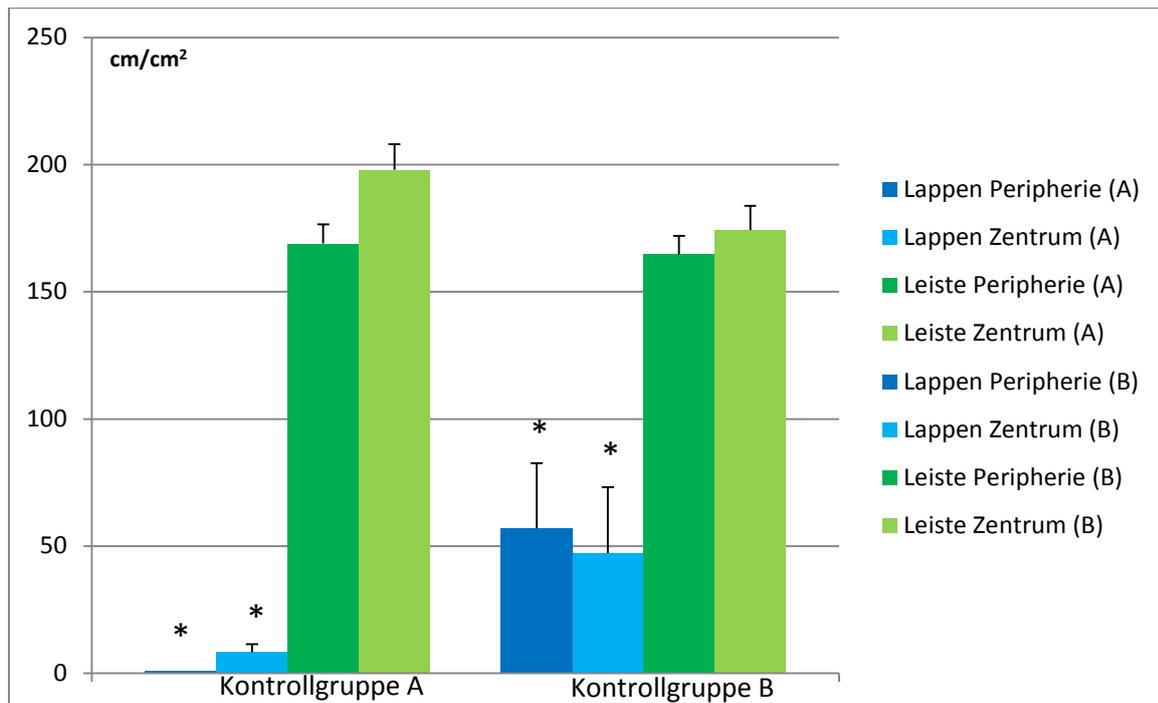


Abbildung 16: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A ($n=5$) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B ($n=8$),

* $p \leq 0,05$ versus kontralaterale Leiste, (Wilcoxon-Test)

Die Kapillardurchmesser der unbehandelten Kontrollgruppe A betrug in der Lappenperipherie $6,25 \mu\text{m}$, im Lappenzentrum $7,23 \mu\text{m}$, in der Leistenperipherie $4,96 \mu\text{m}$ und im Leistenzentrum $4,9 \mu\text{m}$.

Bei der mit Tutofusin behandelten Gruppe lag der durchschnittliche Kapillardurchmesser der Lappenperipherie bei $5,9 \mu\text{m}$, des Lappenzentrums bei $5,5 \mu\text{m}$, der Leistenperipherie bei $4,64 \mu\text{m}$ und des Leistenzentrums bei $4,76 \mu\text{m}$.

5.1.2 Kapillardurchmesser

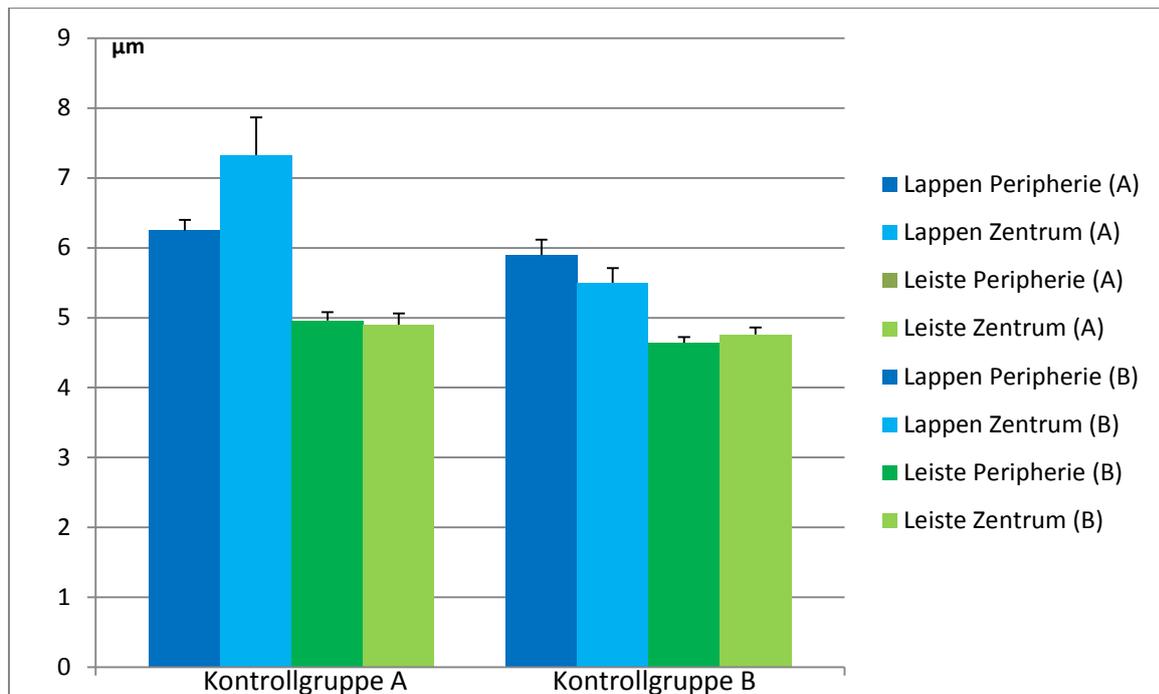


Abbildung 17: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A ($n=5$) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B ($n=8$)

5.1.3 Adhärenzte Thrombozyten

Die mittlere Anzahl adhärenzter Thrombozyten in der unbehandelten Kontrollgruppe A betrug in der Lappenperipherie 1,6, im Lappenzentrum auf 3,4, hingegen in der Leistenperipherie und im Leistenzentrum jeweils nur 0,2. Bei der mit Tutofusin behandelten Kontrollgruppe B lag die mittlere Anzahl adhärenzter Thrombozyten in der Lappenperipherie bei 4,75, im Lappenzentrum bei 3,5, in der Leistenperipherie und im Leistenlappen jeweils bei 0,13.

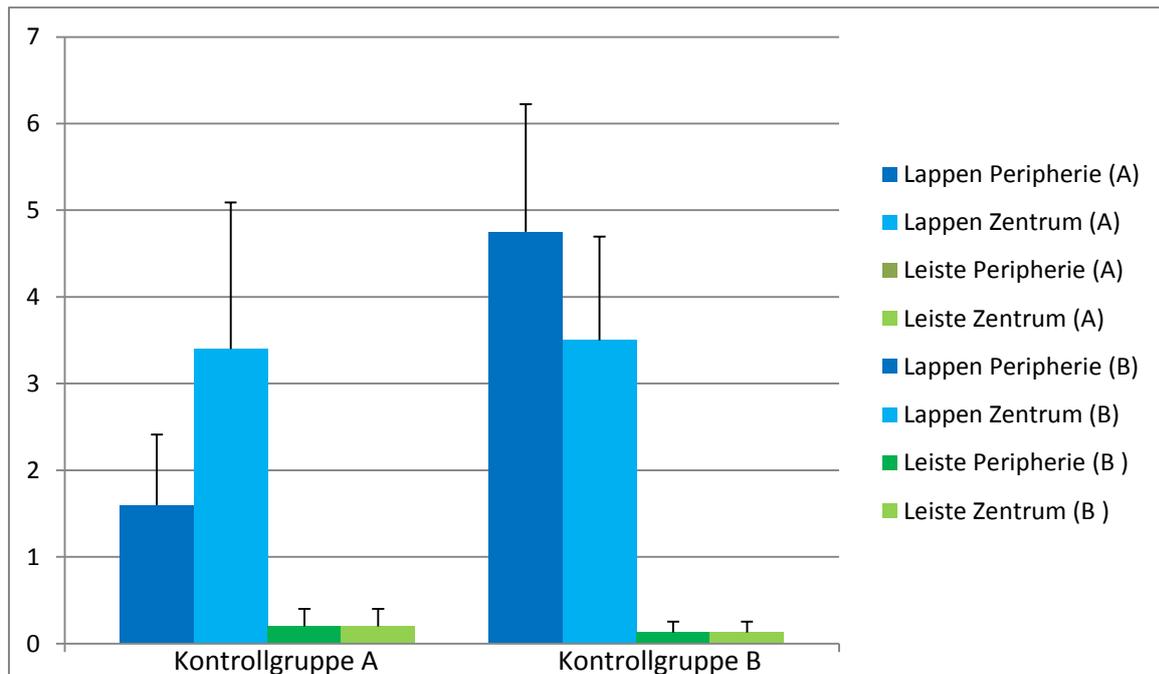


Abbildung 18: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenzter Thrombozyten beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8)

5.1.4 Fließende Thrombozyten

Die mittlere Anzahl in einer Minute fließender Thrombozyten lag bei der unbehandelten Kontrollgruppe A in der Lappenperipherie und im Lappenzentrum bei 0, in der Leistenperipherie bei 29,2 und im Leistenzentrum bei 25,8.

Bei der mit Tutofusin behandelten Kontrollgruppe betrug die mittlere Anzahl in einer Minute fließender Thrombozyten in der Lappenperipherie 7,25, im Lappenzentrum 3,38, in der Leistenperipherie 16,88 und im Leistenzentrum 9,5.

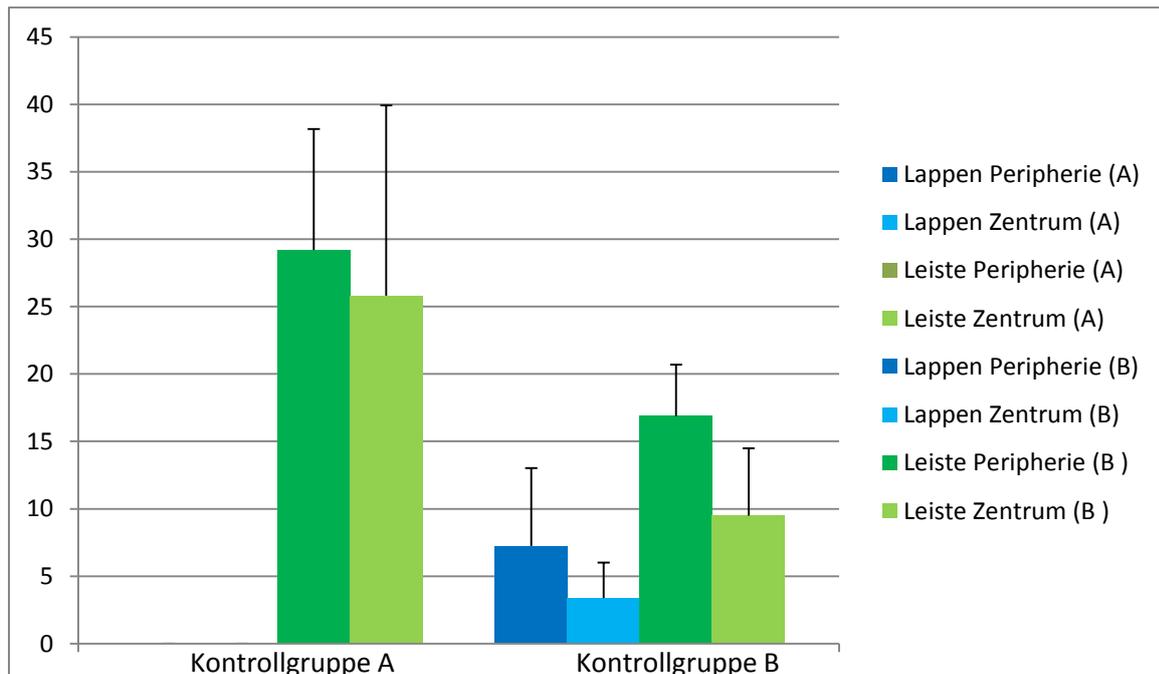


Abbildung 19: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in einer Minute fließender Thrombozyten beim Vergleich der Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8)

5.1.5 Vitalität der Transplantate

Bei den beiden Kontrollgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Vitalität ihrer Lappen (Tabelle 2)

	Vitale Transplantate	Nekrotische Transplantate
Kontrollgruppe A	0	5
Kontrollgruppe B	1	7

Tabelle 2: Vitalität der Transplantate der beiden Kontrollgruppen

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppen (Fisher-Exakt-Test)

5.2 Heparin

5.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Der Unterschied der funktionellen Kapillardichte der Lappen der Tiere mit Heparin behandelten Tiere der Gruppe C war im Vergleich zur Kapillardichte der Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A statistisch signifikant höher (Abb. 20).

In der mit Heparin behandelten Gruppe betrug die funktionelle Kapillardichte in der Lappenperipherie 150,07 cm/cm² und im Lappenzentrum 144,63 cm/cm².

Die funktionelle Kapillardichte der Kontrollgruppe A betrug in der Lappenperipherie 1,12 cm/cm² und im Lappenzentrum 8,34 cm/cm².

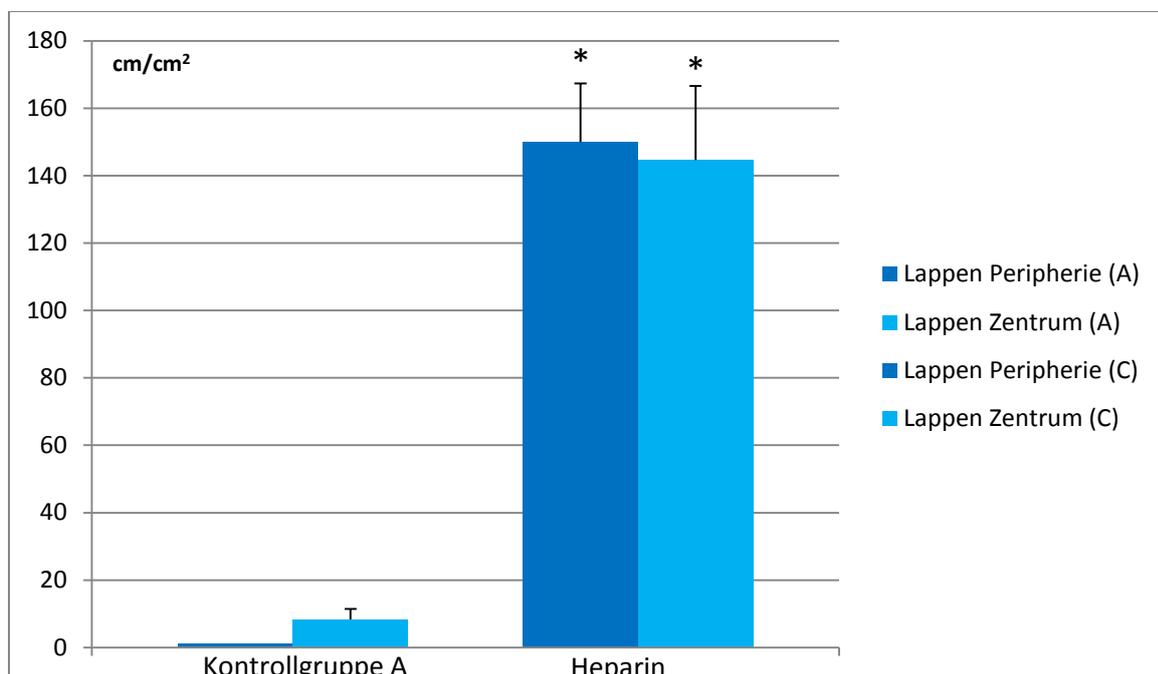


Abbildung 20: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7), *p<0,05 vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test)

Der Unterschied der funktionellen Kapillardichte der Lappen jener Tiere mit Heparin behandelt der Gruppe C war im Vergleich zur Kapillardichte der Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B statistisch signifikant höher (Abb. 21). Die funktionelle Kapillardichte der Kontrollgruppe B betrug in der Lappenperipherie 57,94 cm/cm^2 und im Lappenzentrum 47,23 cm/cm^2 . In der mit Heparin behandelten Gruppe hingegen betrug die funktionelle Kapillardichte in der Lappenperipherie 150,07 cm/cm^2 und im Lappenzentrum 144,63 cm/cm^2 .

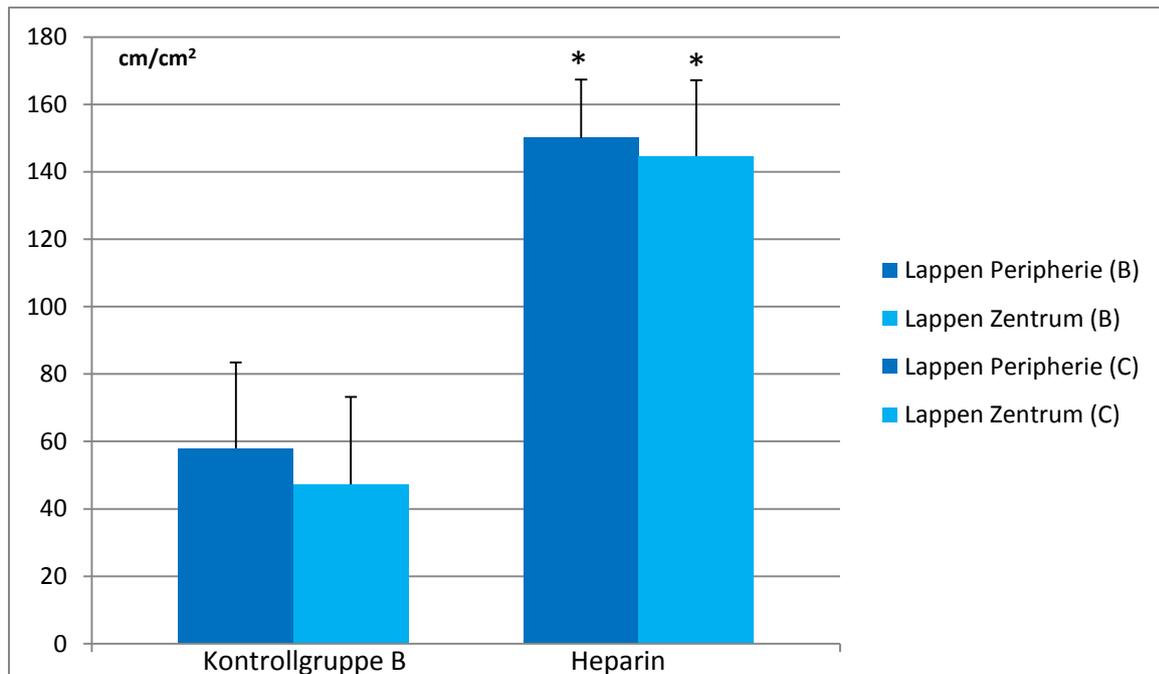


Abbildung 21: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen Gruppe C (Heparin) (n=7), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe B (Mann-Whitney-Test)

5.2.2 Kapillardurchmesser

Es bestand beim Vergleich der Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A mit Tieren der Gruppe C (Heparin) im Lappen ein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 22).

Bei der Kontrollgruppe A betrug der Kapillardurchmesser in der Lappenperipherie 6,25 μm und im Lappenzentrum 7,33 μm . Hingegen betrug der Kapillardurchmesser in der mit Heparin behandelten Gruppe in der Lappenperipherie 5,43 μm und im Lappenzentrum 5,49 μm .

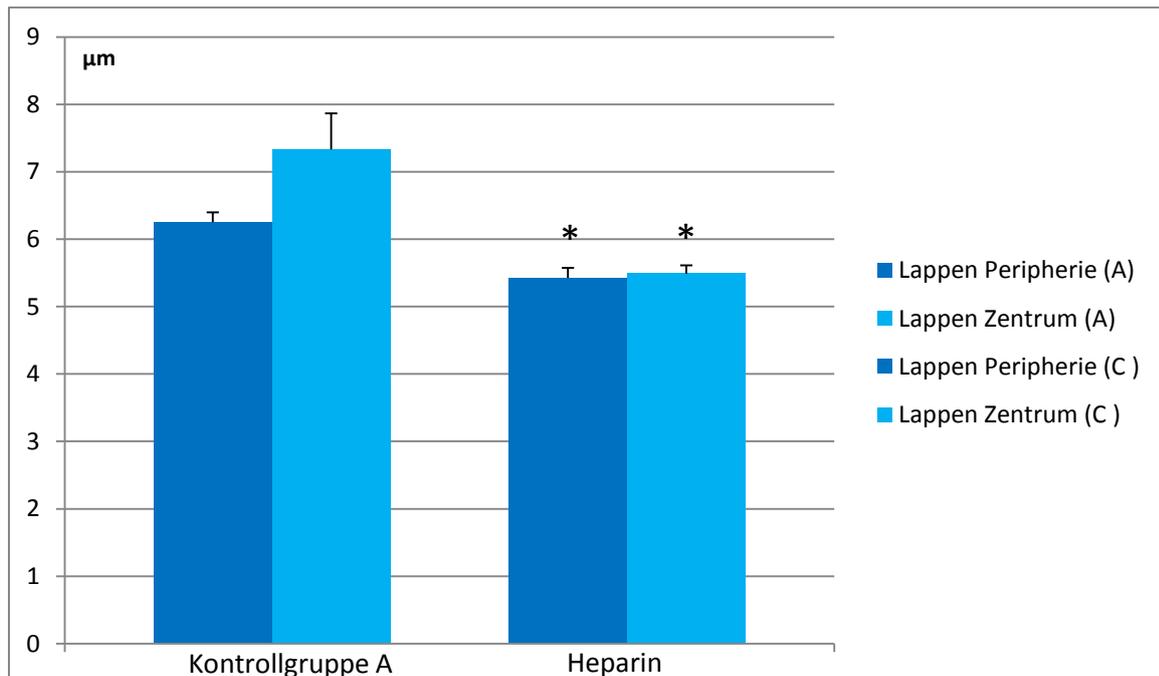


Abbildung 22: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7)

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test, T-Test (Lappen Peripherie))

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppe B mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) unterschieden sich die Kapillardurchmesser bei den Lappen statistisch nicht (Abb. 23). Der Kapillardurchmesser betrug bei der mit einer Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B in der Lappenperipherie 5,9 μm und im Lappenzentrum 5,5 μm . Bei der mit Heparin perfundierten Gruppe betrug der Kapillardurchmesser 5,43 μm in der Lappenperipherie und im Lappenzentrum 5,49 μm .

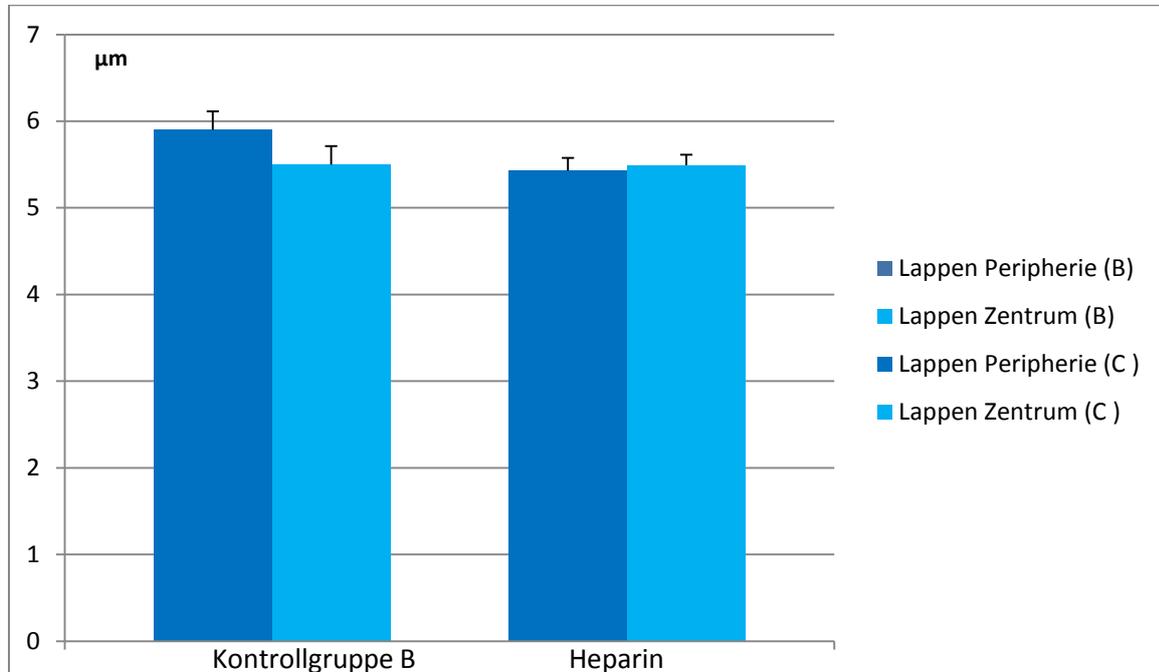


Abbildung 23: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B ($n=8$) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) ($n=7$)

5.2.3 Adhärenente Thrombozyten

Es fand sich kein signifikanter Unterschied adhärenente Thrombozyten beim Vergleich der Lappen und Leisten der Tiere in der mit Heparin behandelten Gruppe (Gruppe C) mit Tieren der Kontrollgruppe A (Abb. 24).

In der unbehandelten Kontrollgruppe A war die mittlere Anzahl adhärenente Thrombozyten in der Lappenperipherie 2, im Zentrum 3. Bei der mit Heparin behandelten Gruppe waren im Mittel 3 adhärenente Thrombozyten in der Lappenperipherie und 5 im Lappenzentrum.

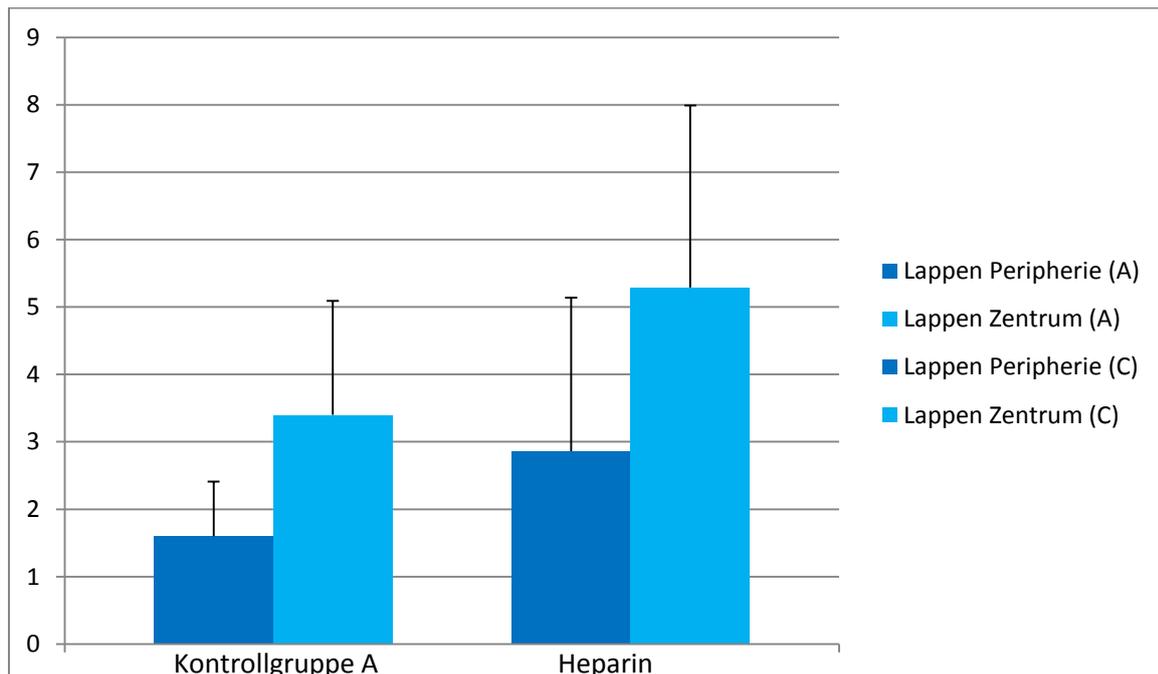


Abbildung 24: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenente Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7)

Es bestand kein statistischer Unterschied im Vergleich der Lappen und Leisten der Tiere in der mit Heparin behandelten Gruppe zu allen Tieren der Kontrollgruppe B (Abb. 25).

Die mittlere Anzahl adhärenter Thrombozyten betrug in der mit der Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B in der Lappenperipherie 5, im Lappenzentrum 4. Im Gegensatz dazu lag die mittlere Anzahl bei der mit Heparin behandelten Gruppe in der Lappenperipherie bei 3 und im Lappenzentrum bei 5.

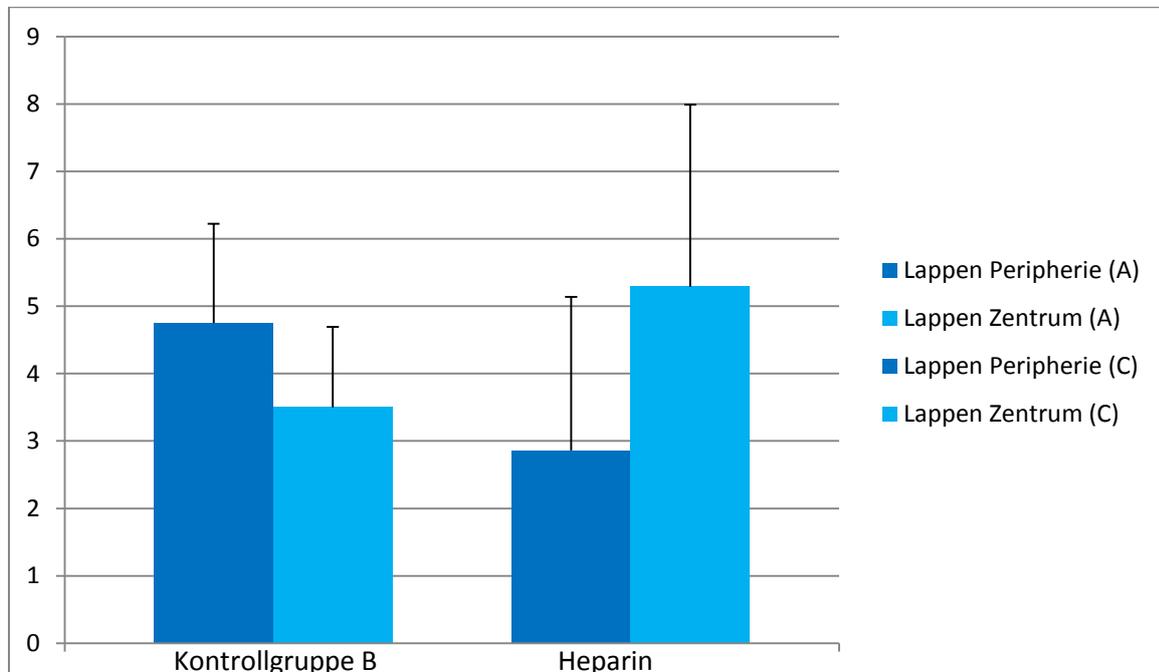


Abbildung 25: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B ($n=8$) mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) ($n=7$)

5.2.4 Fließende Thrombozyten

Beim Vergleich der fließenden Thrombozyten in Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A mit Tieren der Gruppe C (Heparin) im Lappen (Peripherie und Zentrum) war der Unterschied signifikant erhöht (Abb. 26).

Während bei der unbehandelten Kontrollgruppe A sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum des Lappens keine fließenden Thrombozyten zu sehen waren, war die durchschnittliche Anzahl bei der mit Heparin behandelten Gruppe in der Lappenperipherie 9 und im Lappenzentrum 5.

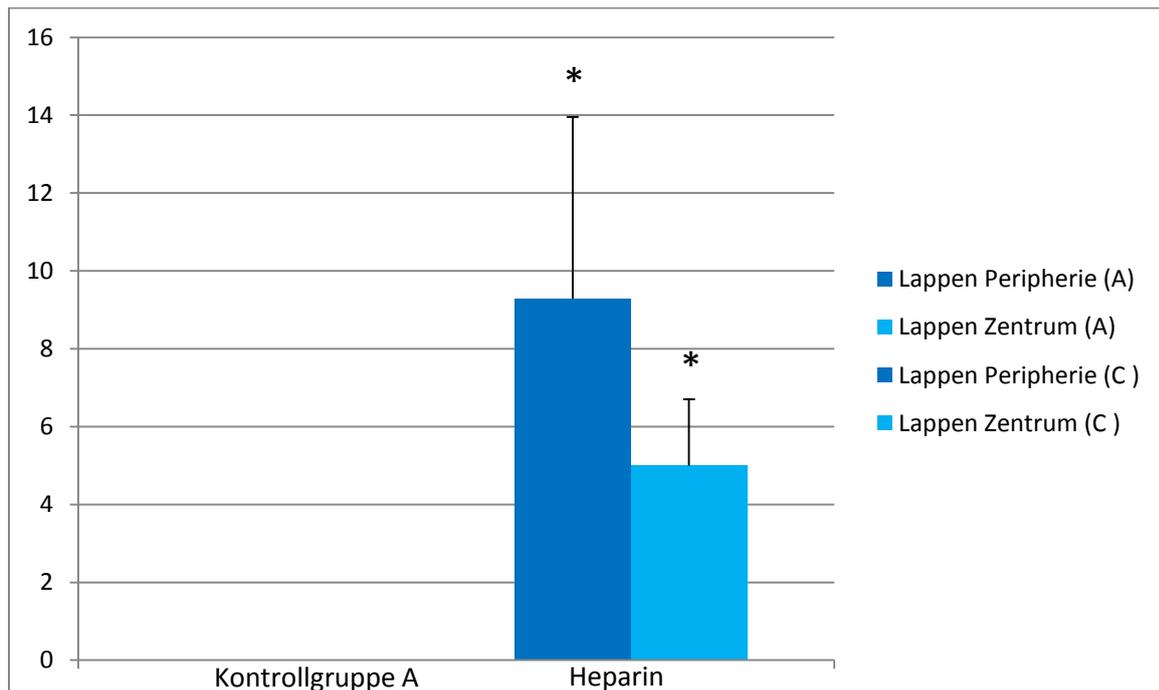


Abbildung 26: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7) $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test).

Beim Vergleich der Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe B mit Tieren der Gruppe C (Heparin) zeigte sich im Lappen (Peripherie und Zentrum) kein signifikanter Unterschied (Abb. 27).

In der Lappenperipherie der mit der Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B flossen durchschnittlich 7 Thrombozyten, im Lappenzentrum 3. Bei der Heparin-Gruppe flossen in der Lappenperipherie durchschnittlich 9 und im Lappenzentrum 5.

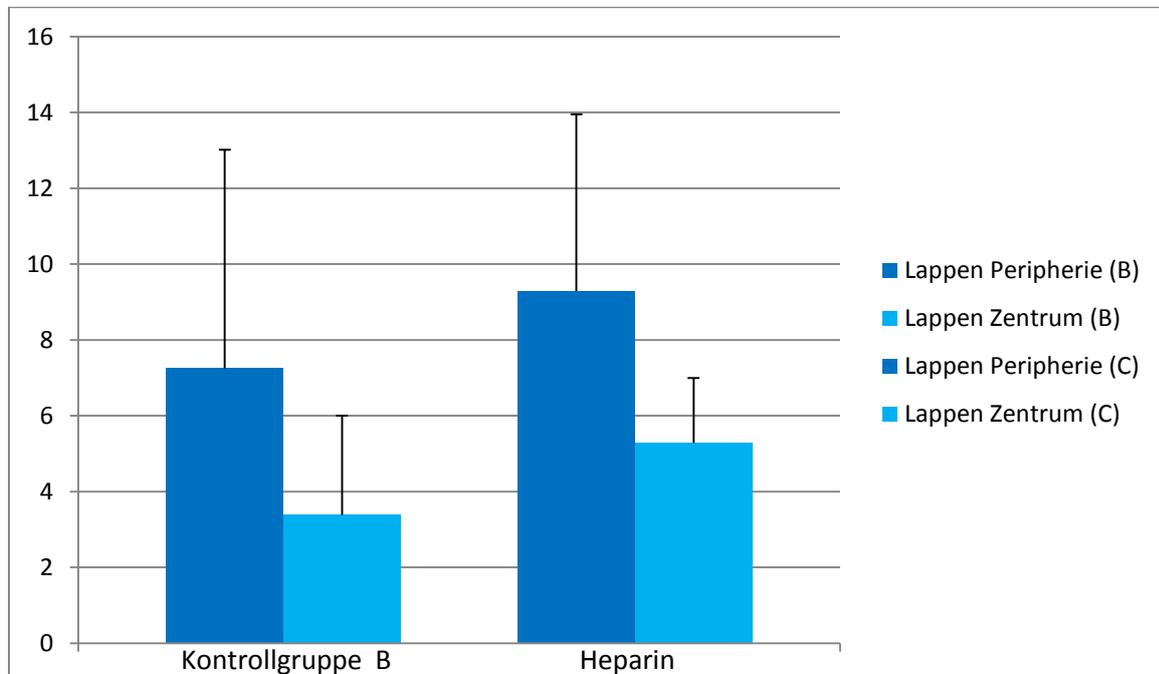


Abbildung 27: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B ($n=8$) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) ($n=7$)

5.2.5 Vitalität der Transplantate

5.2.5.1 Kontrollgruppen versus Heparin

Beim Vergleich beider Kontrollgruppen A und B mit der mit Heparin behandelten Gruppe C konnte ein signifikanter Unterschied der Vitalität dieser Lappen festgestellt werden (Tabelle 3).

	Vitale Transplantate	Nekrotische Transplantate
Kontrollgruppe A	0	5
Kontrollgruppe B	1	7
Heparin	7*	2*

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppen, Fisher-Exakt-Test

Tabelle 3: Vitalität der Transplantate der Kontrollgruppen versus Heparin

5.3 Rekombinanter tissue-type Plasminogen-Aktivator (rtPA)

5.3.1 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte in den Lappen war in der Therapiegruppe D (rtPA) statistisch signifikant höher als in beiden Kontrollgruppen A und B (Abb. 28 und 29).

In der unbehandelten Kontrollgruppe A betrug die durchschnittliche Kapillardichte in der Lappenperipherie 1,12 cm/cm², im Lappenzentrum 8,34 cm/cm². In der Lappenperipherie der mit rtPA behandelten Gruppe war die funktionelle Kapillardichte in der Lappenperipherie 158,7 cm/cm² und im Lappenzentrum 186,9 cm/cm².

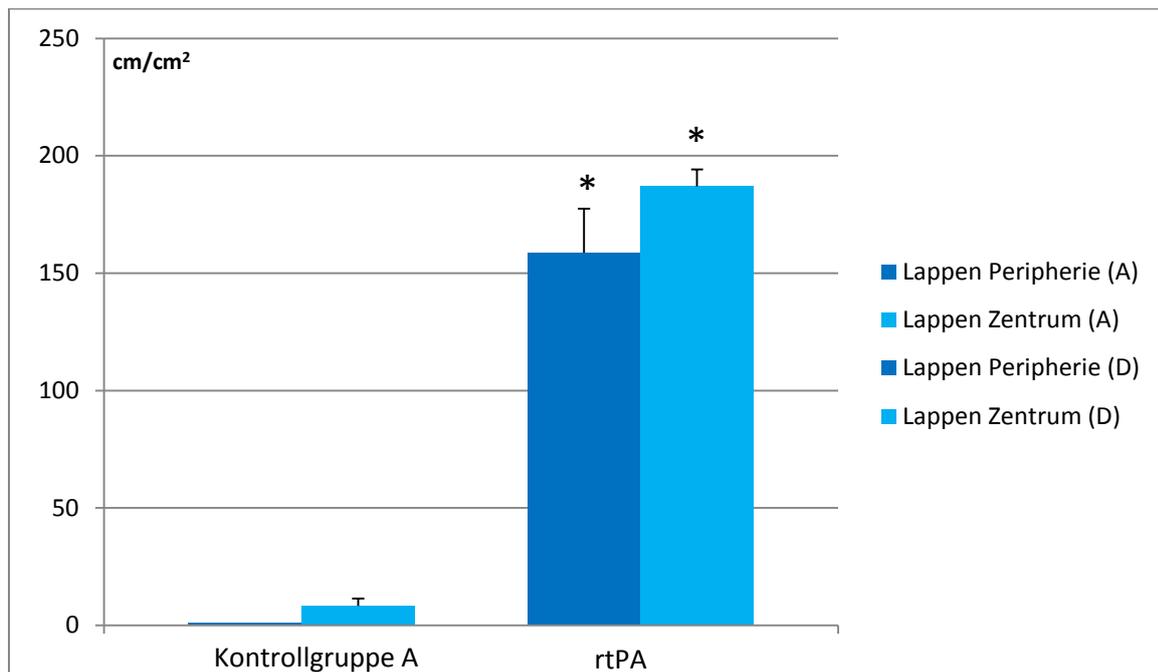


Abbildung 28: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test)

Die durchschnittliche funktionelle Kapillardichte in der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B betrug in der Lappenperipherie 57,9 cm/cm², im Lappenzentrum 47,2 cm/cm². In der Lappenperipherie der mit rtPA behandelten Gruppe war die funktionelle Kapillardichte in der Lappenperipherie 158,7 cm/cm² und im Lappenzentrum 186,9 cm/cm².

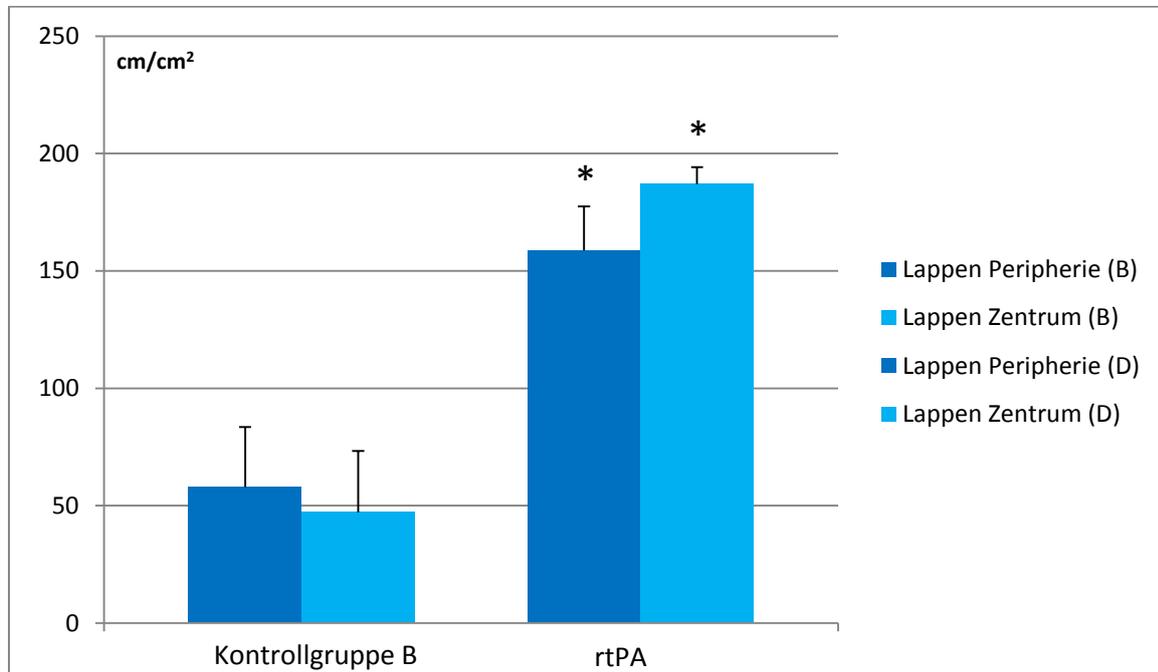


Abbildung 29: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6), *p<0,05 vs. Kontrollgruppe B, (Mann-Whitney-Test)

5.3.2 Kapillardurchmesser

Der Kapillardurchmesser war in der mit rtPA therapierten Lappen der Gruppe D im Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A signifikant höher (Abb.30).

In der unbehandelten Kontrollgruppe A lag der durchschnittliche Kapillardurchmesser in der Lappenperipherie bei 6,25 μm , im Lappenzentrum bei 7,33 μm . In der mit rtPA behandelten Gruppe hingegen betrug der durchschnittliche Kapillardurchmesser in der Lappenperipherie 5,46 μm und im Lappenzentrum 5,36 μm .

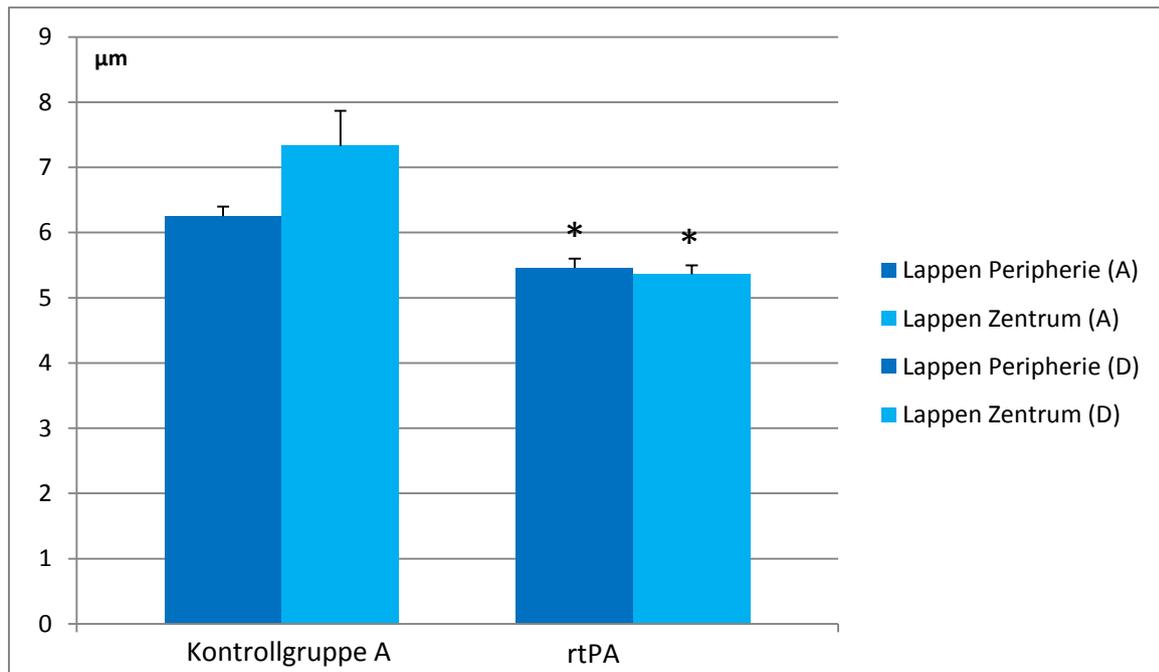


Abbildung 30: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den vitalen Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test (Lappen-Peripherie), T-Test)

Die Lappen der mit rtPA behandelten Tiere unterschieden sich statistisch nicht von den mit Vollelektrolytlösung behandelten Lappen der Kontrollgruppe B (Abb. 31).

Die Kapillardurchmesser in der mit einer Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B betragen in der Lappenperipherie durchschnittlich 5,9 μm , im Lappenzentrum 5,5 μm .

In der mit rtPA behandelten Gruppe hingegen waren sie in der Lappenperipherie im Schnitt 5,5 μm und im Lappenzentrum 5,4 μm .

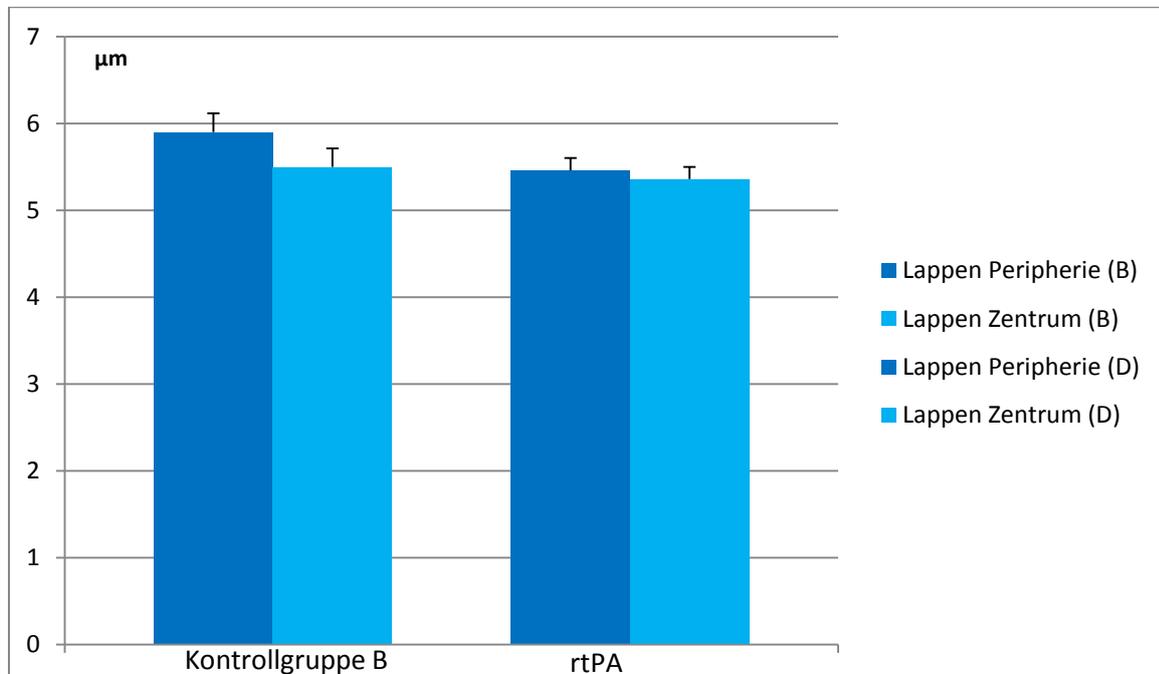


Abbildung 31: Kapillardurchmesser (μm) ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B ($n=8$) verglichen mit den vitalen Lappen der Gruppe D (rtPA) ($n=6$)

5.3.3 Adhärenente Thrombozyten

Im Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A mit Tieren der Gruppe D (rtPA) bestand im Hinblick auf einen Unterschied in der Anzahl der adhärenente Thrombozyten im Lappen kein signifikanter Unterschied (Abb. 32).

Über mindestens 30 Sekunden waren in der unbehandelten Kontrollgruppe A in der Lappenperipherie durchschnittlich 1,6 Thrombozyten adhärenent, im Lappenzentrum 3,4. In der mit rtPA behandelten Gruppe waren 3 Thrombozyten in der Lappenperipherie adhärenent, im Lappenzentrum 2,5.

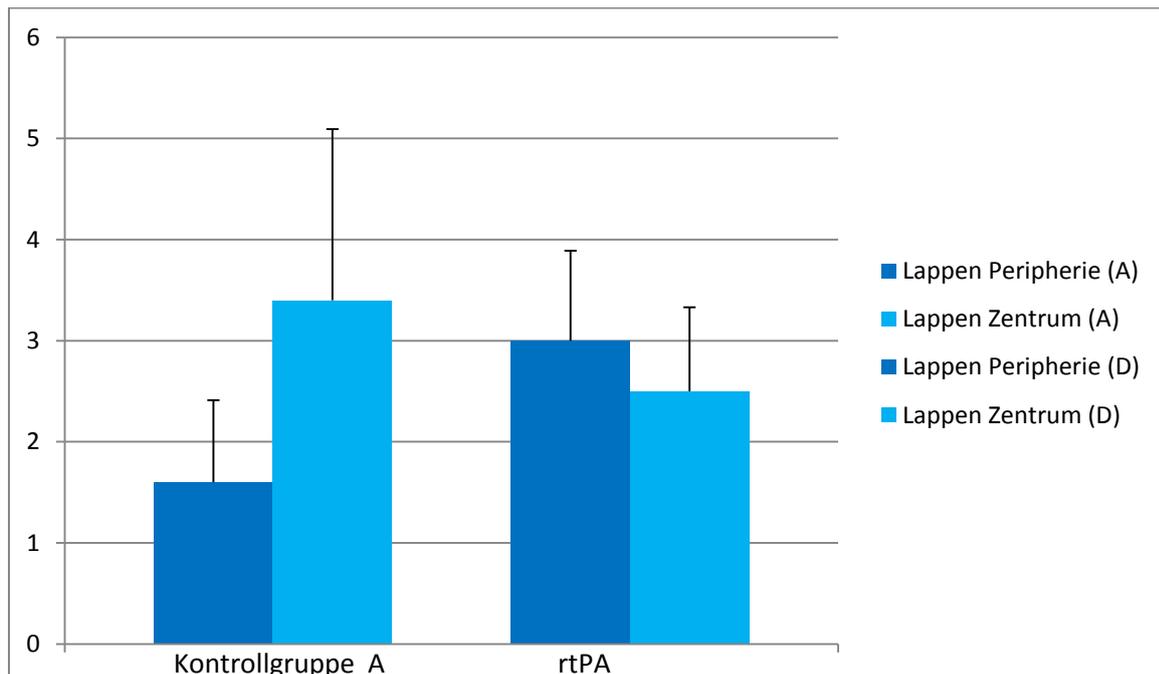


Abbildung 32: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenente Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)

Die Lappen der mit rtPA behandelten Tiere (Gruppe D) unterschieden sich statistisch nicht von den Lappen der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B im Hinblick auf eine unterschiedliche Anzahl adhärenter Thrombozyten (Abb. 33).

Im Durchschnitt waren in der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B in der Lappenperipherie 5 Thrombozyten adhären, im Lappenzentrum 4. In der mit rtPA behandelten Gruppe waren in der Lappenperipherie 3 und im Lappenzentrum 3 Thrombozyten adhären.

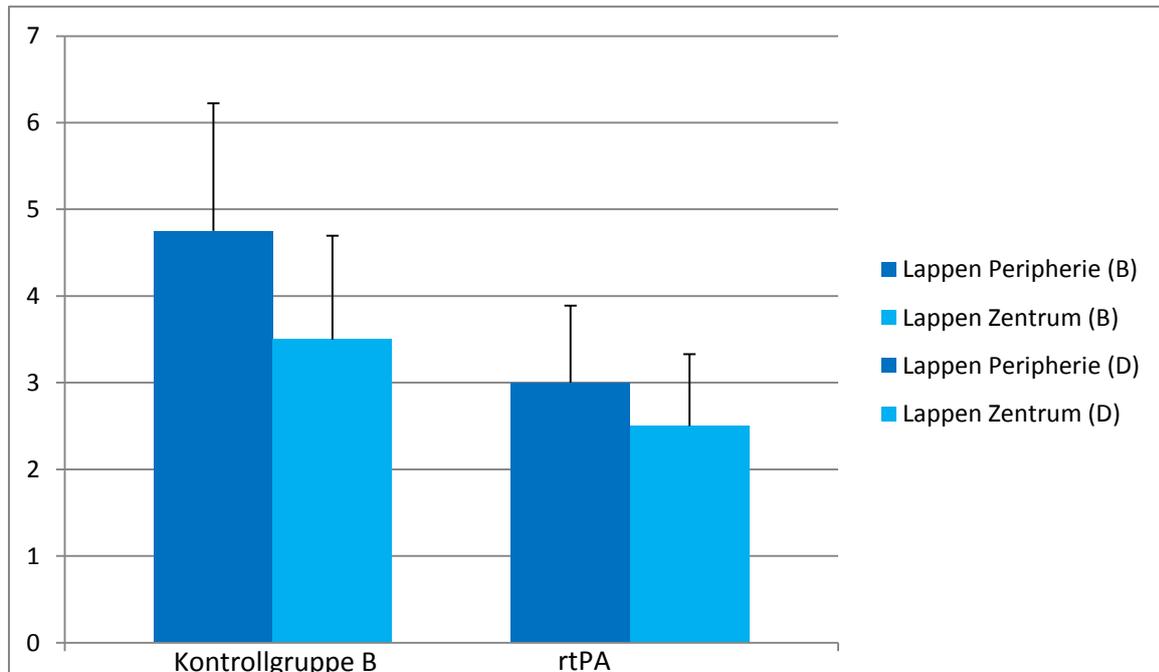


Abbildung 33: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)

5.3.4 Fließende Thrombozyten

Die Anzahl der fließenden Thrombozyten war in der mit rtPA therapierten Lappen der Gruppe D im Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A signifikant höher (Abb 34).

In der Lappenperipherie und im Lappenzentrum der unbehandelten Kontrollgruppe A flossen keine Thrombozyten, wohingegen bei der mit rtPA behandelten Gruppe in der Lappenperipherie durchschnittlich 7 und im Lappenzentrum 6 Thrombozyten flossen.

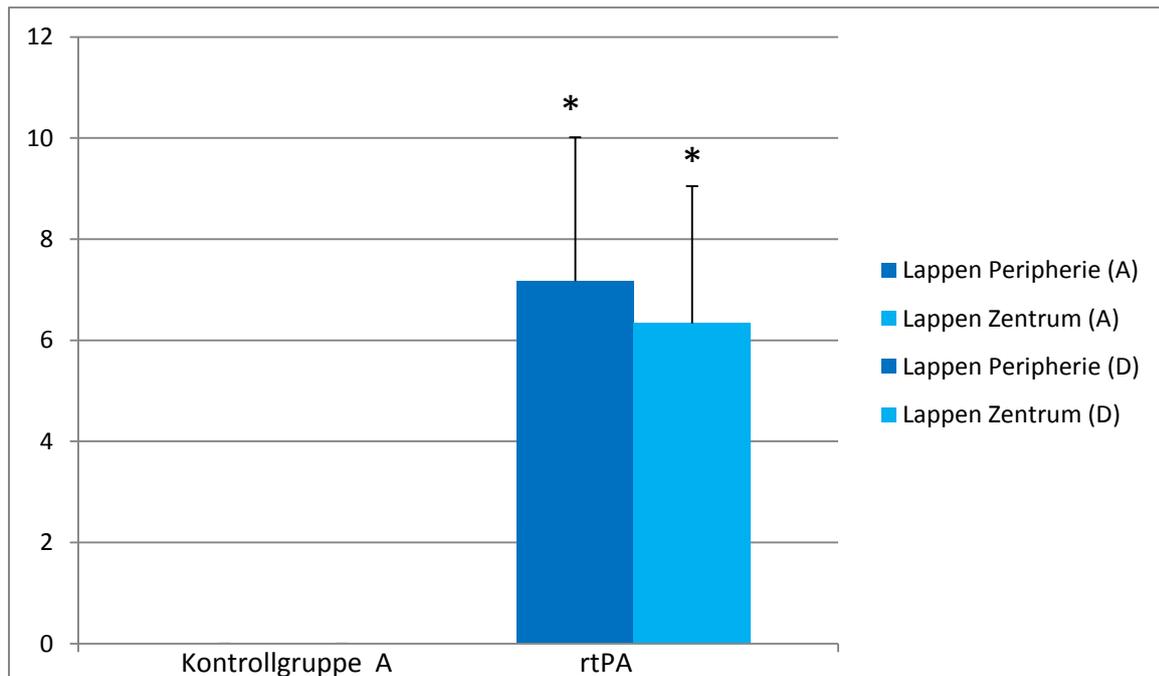


Abbildung 34: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (n=6), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test)

Es fand sich kein signifikanter Unterschied fließender Thrombozyten beim Vergleich der Lappen und Leisten der Tiere in der mit rtPA behandelten Gruppe (Gruppe D) zu allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (Abb. 35).

In der Lappenperipherie der mit einer Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B flossen durchschnittlich 7 Thrombozyten, im Lappenzentrum 3. Bei der mit rtPA behandelten Gruppe flossen in der Lappenperipherie durchschnittlich 7 und im Lappenzentrum 6 Thrombozyten.

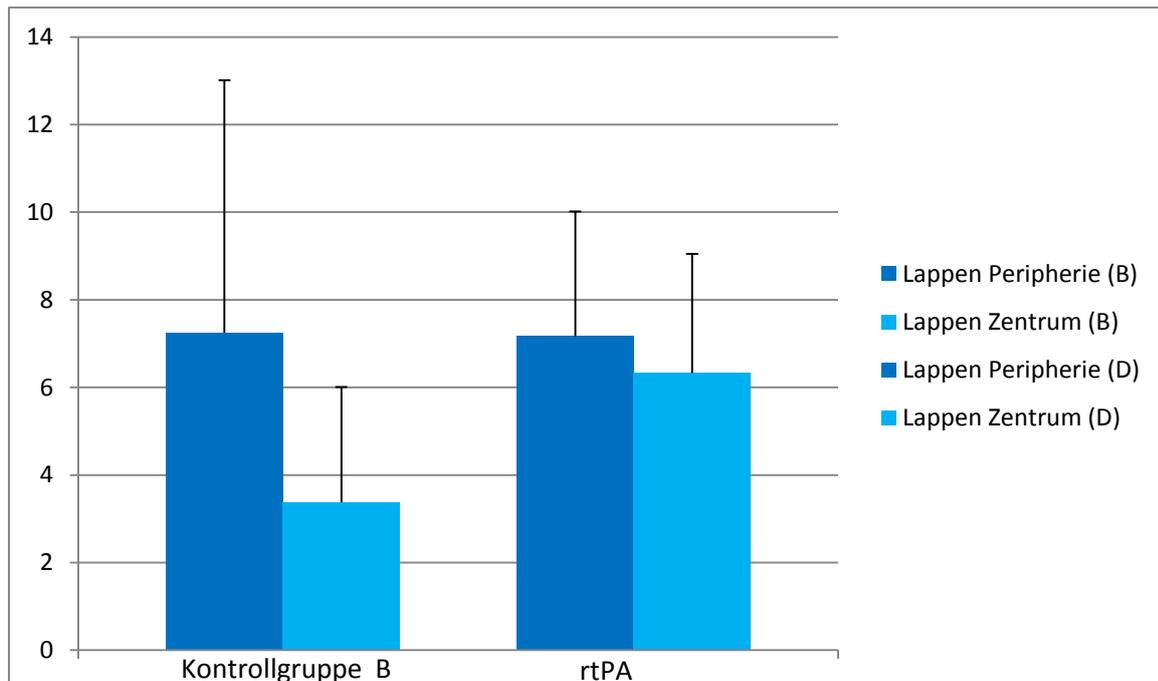


Abbildung 35: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (n=6), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe B (Mann-Whitney-Test)

5.3.5 Vitalität der Transplantate

5.3.5.1 Kontrollgruppe A versus rtPA

Die Vitalität der Lappen der mit rtPA behandelten Gruppe unterschied sich statistisch signifikant von den Lappen der unbehandelten Kontrollgruppe A (Tab 4).

	Vitale Transplantate	Nekrotische Transplantate
Kontrollgruppe A	0	5
rtPA	6*	4*

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppen (Fisher-Exakt-Test)

Tabelle 4: Vitalität der Transplantate der unbehandelten Kontrollgruppe A versus rtPA

5.3.5.2 Kontrollgruppe B versus rtPA

Die Vitalität der Lappen der mit rtPA behandelten Gruppe unterschied sich statistisch nicht signifikant von den Lappen der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (Tab 5).

	Vitale Transplantate	Nekrotische Transplantate
Kontrollgruppe B	1	7
rtPA	6	4

Tabelle 5: Vitalität der Transplantate der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe A versus rtPA

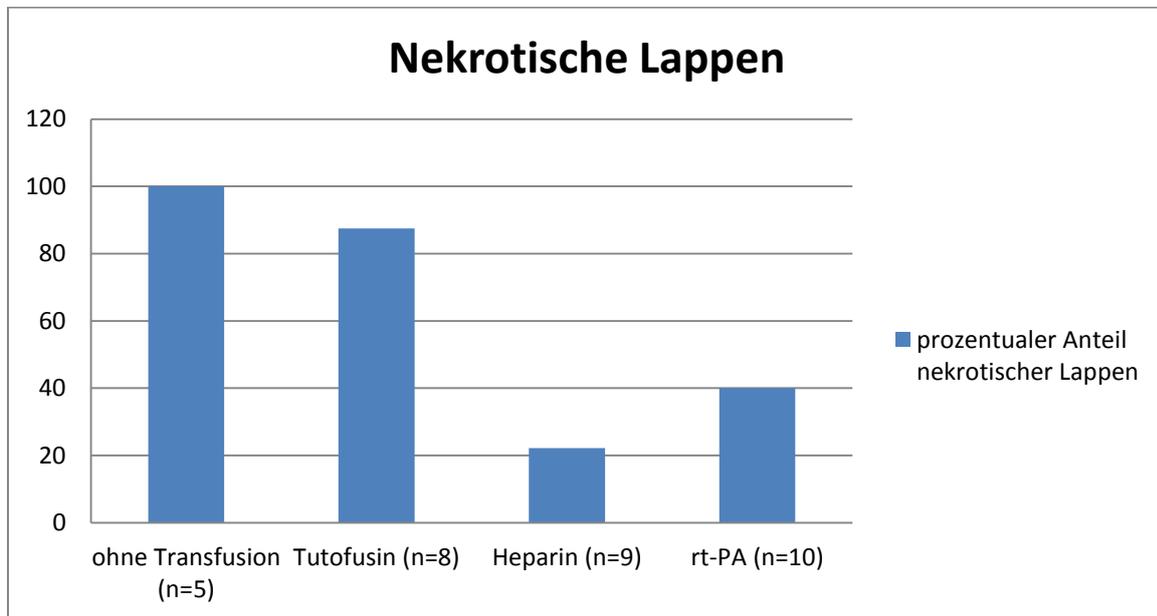


Abbildung 36: Anteil nekrotischer Lappen in allen Gruppen

6 Diskussion

6.1 Ziel der Studie

Ein freier Lappen ist ein Gewebetransplantat, das mit seinen eigenen axialen blutversorgenden Gefäßen an einen neuen Ort transplantiert wird. 1973 berichteten Daniel und Taylor (Daniel RK, 1973) von der ersten freien Lappentransplantation. Sie hoben einen freien Leistenlappen, der von A. und V. circumflexa ilium superficiales, um einen Defekt im Bereich des Unterschenkels zu decken. Die Möglichkeit, mit Hilfe von mikrovaskulären Anastomosen Gewebe zu transferieren war eine Revolution in der rekonstruktiven Chirurgie. Jedoch ist die primäre intraoperative und sekundäre postoperative Ischämie eine ernsthafte Bedrohung im Hinblick auf die Vitalität eines freien Lappens nach dem Transfer (Longstreet N, 2009). Ein Ungleichgewicht der Homöostase der mikrovaskulären Perfusion führt zur Entstehung von Thrombosen, da sowohl thrombogenetische als auch fibrinolytische Mechanismen durch Ischämie und Verletzung aktiviert werden (Birk-Sørensen L, 1997). Eine Ischämie kann prinzipiell folgende Ursachen haben: einen arteriellen oder einen venösen Gefäßverschluss. Dabei behindert ein arterieller Gefäßverschluss den Zufluss zum Lappen und in dem abhängigen Gewebe entsteht eine Anoxämie. Das Gewebe hat makroskopisch eine blasse Farbe ohne Stauungszeichen oder Ödemneigung.

Bei einer venösen Stase kommt es zum Aufstau des Blutes in den Gefäßen, im angestauten Blut kann durch Aktivierung des Gerinnungssystems eine Thrombose entstehen.

Seit über 20 Jahren ist die Thrombose als Hauptgrund des Verlusts freier Lappentransplantate von vielen Autoren (Hayden RE, 1989), (Romano JE, 1989) angesehen. Vor dieser Zeit war die chirurgische Revision die einzige Methode, die Lappentransplantate zu retten (Hayden RE, 1989).

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die gerinnungsaktiven Pharmaka Heparin und rtPA eine Verbesserung auf die Überlebensrate freier mikrochirurgischer Haut- und Weichteiltransplantate haben und im klinischen Alltag zusätzlich zu einer Thrombektomie eingesetzt werden können.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Kontrollgruppen

Das Abklemmen der Lappenvene führte in beiden Kontrollgruppen zu einer signifikanten Abnahme der funktionellen Kapillardichte in den transplantierten Lappen im Vergleich zu den kontralateralen Leisten.

Intravitalmikroskopisch bestimmte Kapillardurchmesser, fließende Thrombozyten und adhärenente Thrombozyten unterschieden sich jedoch in den beiden Kontrollgruppen nicht signifikant.

6.2.2 Heparin

6.2.2.1 Kapillardichte bei Heparin im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen

Die Kapillardichte der mit Heparin behandelten Versuchsgruppe war im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht.

6.2.2.2 Kapillardurchmesser bei Heparin im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen

Hierbei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Kapillardurchmessern der mit Heparin behandelten Versuchsgruppe verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe A. Kein signifikanter Unterschied bestand in den Kapillardurchmessern der Lappen der mit Heparin behandelten Versuchsgruppe und der mit einer Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B.

6.2.2.3 Fließende Thrombozyten bei Heparin im Vergleich mit der Kontrollgruppe A

Die Anzahl der fließenden Thrombozyten war in den Lappen der mit Heparin behandelten Gruppe signifikant höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe A, wo hingegen der Unterschied zur mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B nicht signifikant war.

6.2.2.4 Adhärenente Thrombozyten bei Heparin im Vergleich mit den Kontrollgruppen

Hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Lappen und Leisten zu messen.

6.2.3 rtPA

6.2.3.1 Kapillardichte bei rtPA im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen

Im Vergleich der mit rtPA behandelten Gruppe mit den beiden Kontrollgruppen bestand in den Lappenzentren und -peripherien bei den Kapillardichten ein signifikanter Unterschied.

6.2.3.2 Kapillardurchmesser bei rtPA im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen

Zwischen der mit rtPA behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe A bestand ein signifikanter Unterschied bei den Kapillardurchmessern der Lappenzentren und -peripherien. Bei der Kontrollgruppe B mit Vollelektrolytlösung konnte ein signifikanter Unterschied zur mit rtPA behandelten Gruppe im Hinblick auf die Peripherie der Leisten gemessen werden. Leiste Zentrum und Lappen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

6.2.3.3 Fließende Thrombozyten bei rtPA im Vergleich mit den Kontrollgruppen

Hier war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

6.2.3.4 Adhärenente Thrombozyten bei rtPA im Vergleich mit den Kontrollgruppen

Hier war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

6.3 Methodik / Methodenkritik

6.3.1 Modell und Versuchstiere

Da in diesem Modell die intravitalmikroskopische Analyse der transplantierten Gewebelappen zur Beurteilung derer Perfusion angewandt wurde, kamen aus technischen Gründen nur Kleintiere in Frage. Es wurde das Modell der autologen Transplantation von Gewebelappen von der Leiste an den Hals der Ratte gewählt. Bereits in früheren Studien wurde die Ratte als Quelle vieler mikrochirurgischer Lappen-Modelle herangezogen (Zhang F, 2001). Das Modell der freien epigastrischen Lappen-Transplantation hat sich in experimentellen Transplantationsstudien etabliert (Ruby LK, 1984). Bei der umgekehrten Transplantationsrichtung von der Brust an die Leiste waren die Ergebnisse ebenso einfach

und zuverlässig, jedoch besteht die Aufbissgefahr der transplantierten Lappen durch die Ratten (Miyamoto S, 2008).

Unsere Wahl fiel auf männliche Sprague-Dawley-Ratten, da diese gutmütigen, leicht handhabbaren Versuchstiere aufgrund ihrer Größe sowohl operationstechnisch als auch im Hinblick auf die mikroskopische Analyse optimal sind. Viele Studien wurden bereits erfolgreich mit diesen Tieren durchgeführt. (Frick A, 1999), (Andersen M, 1999), (Angel MF, 1992), (Kirschner RE, 1999).

6.3.2 Methode / Präparation

Thrombosen mikrovaskulärer Anastomosen treten bei Fehlern bei der Naht und stark geschädigten Empfängerarterien auf (Lidman D, 1981). Dies wurde jedoch auf unerfahrene Chirurgen oder übermäßige Müdigkeit zurückgeführt (Lidman D, 1981). Wir hatten bei der Lappentransplantation besonders darauf geachtet, dass die neu anastomosierten Gefäße weder torquiert noch übermäßig komprimiert wurden. Nur diejenigen Tiere, bei denen 24 Stunden später eine intakte Anastomose und ein vitales Transplantat nachgewiesen waren, haben die weiteren Untersuchungen durchlaufen. Eine thrombosierte Lappenarterie oder Lappenvene war ein Ausschlusskriterium. Am Folgetag (24 Stunden später) wurde im distalen Stumpf der Arteria femoralis superficialis des Lappens ein Katheter zur Infusion der Pharmaka eingelegt. Nach Abschluss der Infusion wurde die Vene für 35 Minuten abgeklemmt, um experimentell eine standardisierte, temporäre venöse Stase zu erzeugen. Durch Vorversuche an mehreren Testtieren (n=13) vor dem eigentlichen Versuchsstart mit unterschiedlichen Abklemmzeiten wurde herausgefunden, dass es bei einer Abklemmzeit von 35 Minuten zu 100% immer zum Lappenverlust kommt (ohne „Therapie“).

6.3.3 Prüfsubstanzen

Eine Vielzahl von Substanzen wie Aspirin (Renaud F, 1996), Urokinase (D'Arpa S, 2005) (Serletti JM, 1998), Streptokinase (Lipton HA, 1987), Heparin (Kirschner RE, 1999) (Hjortdal VE, 1994), Deferoxamin (Longstreet N, 2009) (Angel MF, 1989), Thromboxansynthase-Inhibitor (Mellow CG, 1990), Iloprost (Frick A, 1999), Cicaprost (Renaud F, 1996), L-Nitro-amino-methyl-arginine (Knox LK, 1996), Dexamethason (Willemart G, 1998) oder gar eine Kombination aus mehreren Substanzen gleichzeitig (Lepore DA, 1994) zur Verbesserung der Überlebensrate von Lappentransplantaten sind in der Vergangenheit be-

reits untersucht worden.

Mit Iloprost und Cicaprost beispielsweise wurden bereits ischämische Effekte deutlich verringert und die Überlebensrate der Lappen signifikant erhöht (Frick A, 1993). Die systemische Anwendung hatte allerdings auch eine erhöhte Blutungskomplikation zur Folge. Eine Applikation hoher Dosen von Aspirin präoperativ vor einer Lappenplastik ohne eigene axiale Gefäßversorgung hatte die Überlebensrate der Lappen eher aufgrund seiner Effekte auf Entzündungsreaktion und/oder Vasodilatation und weniger wegen seiner Thrombozytenaggregationshemmung erhöht. Eine Gabe von Aspirin postoperativ ergab keinen Unterschied zur Kontrollgruppe im Hinblick auf die Lappenüberlebensrate. Somit besteht eine deutliche Abhängigkeit der zeitlichen Applikation (Shalom A, 2007).

Eine Studie der mikrovaskuläre Perfusion in Kremastermuskulatur-Lappen bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten ergab eine deutlich verbesserte Kapillardurchblutung und Lappenüberlebensrate nach tPA-Applikation nach einem künstlich herbeigeführten thrombotischen Ereignis (Krapohl BD, 2000).

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob Heparin einen Einfluss auf die Überlebensrate von Muskellappen nach sekundärer venöser Ischämie und Revaskularisation hat. Dabei hatte die lokale Infusion von Heparin die Überlebensrate der Lappen signifikant erhöht, ohne dabei einen Effekt auf die systemische Koagulation zu haben (Kirschner RE, 1999).

Wir konnten zeigen, dass rtPA und Heparin erfolgreich bei der freien Lappentransplantation eingesetzt werden konnte.

6.3.4 Venöse Stase

Um eine sekundäre Ischämie zu induzieren, muss experimentell eine kritische Ischämiezeit überschritten werden, bei der 50% der Lappen vital oder nekrotisch werden. Dies wurde im Vorversuch nach einem Test mehrerer Zeiten bei 35 Minuten bestimmt. In der Literatur werden unterschiedlichste Zeiten bis zu mehreren Stunden in den Studien beschrieben. Frick et al (Frick A, 1999) fanden in früheren Versuchen eine letale Ischämiezeit von 20 Minuten. Eine Studie (Gabriel A, 2001) über den Effekt eines totalen venösen Verschlusses auf den Kapillarfluss und die Nekrosen im Skelettmuskel bei Wistar-Ratten hatte als Grundlage 0, 10, 30 und 60 Minuten Verschluss. Dabei wurde gezeigt, dass ein signifikanter Abfall der Anzahl perfundierter Kapillaren zwischen 30 und 60 Minuten zu verzeichnen war. Unsere experimentell ermittelte Zeit von 35 Minuten entspricht somit die-

sem Ergebnis. Dies macht deutlich, dass innerhalb kurzer Zeit der venösen Stase ein irreversibler Schaden am Gewebe auftreten kann.

6.3.5 Intravitalmikroskopie (IVM)

Die Intravitalmikroskopie ist eine in-vivo-Untersuchung. Sie wird durchgeführt, um Phänomene zu untersuchen, die nicht an fixierten / toten Objekten oder isolierten Zellen oder Geweben durchführbar sind. Sie wird als Goldstandard für in-vivo-Untersuchungen dynamischer mikrovaskulärer Regulation angesehen (Tabuchi A, 2008) und im Speziellen zur Analyse der mikrovaskulären Perfusion nach freiem Gewebetransfer (Frick A, 1999) (Rücker M, 1999).

Die Intravitalmikroskopie wurde erstmals von Rudolf Wagner (1839) und Julius Friedrich Cohnheim (1889) im neunzehnten Jahrhundert beschrieben (Sumen C, 2004). Cohnheim deckte mit ihrer Hilfe zelluläre Mechanismen der Entzündungspathogenese auf. Er beschrieb die Migration von Leukozyten durch die Gefäßwände. Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine von mehreren Varianten dar. Bis heute sind viele Organsysteme intravitalmikroskopisch untersucht worden, wie Lungen (Tabuchi A, 2008) (Eichhorn ME, 2002), Gehirn (Yong T, 1997), Pankreas (Keck T, 2001), Herz (Ruhparwar A, 2006), Leber (Robertson JH, 2008), Skelettmuskulatur (Asai A, 2007), Haut (Barker JH, 1990).

In der vorliegenden Studie interessierten uns die mikrovaskuläre Perfusion, die Gefäße durchfließenden Thrombozyten und die Thrombozytenadhäsion an den Gefäßendothelien sowie der Kapillardurchmesser im transplantierten Lappen.

Die Analyse der Parameter während der Intravitalmikroskopie wäre zu langwierig bzw. technisch nicht möglich gewesen. Die Beobachtungen wurden auf Videobänder aufgenommen und im Anschluss daran offline (CapImage, Dr. Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. Der wesentliche Vorteil ist die Auswertung offline anhand der Videoaufzeichnungen.

6.3.6 Thrombozyten-Färbung

Um in der Intravitalmikroskopie die Thrombozyten darstellen zu können war es notwendig, diese zuvor ex vivo mit einem Fluoreszenzmarker zu markieren.

Unsere Wahl fiel auf Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE), welcher sein Absorptionsmaximum bei 492 nm und sein Emissionsmaximum bei 517 nm hat. Da ausschließlich die Thrombozyten markiert werden sollten, mussten Thrombozyten eines Spendertieres gewonnen, ex vivo angefärbt und dem Versuchstier appliziert werden. Die

Thrombozytenisolierung und anschließende Markierung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes entspricht weitestgehend dem Vorgehen, das in früheren Literaturen bereits beschrieben wurde (Tailor A, 2003) (Waldner M, 2007). In einem Coulter-Counter wurde die Quantität der gewonnenen Thrombozyten überprüft. Die Applikation erfolgte anschließend über einen Katheter in der Vena femoralis superficialis in der rechten Leiste.

Der Farbstoff Rhodamin wurde zwar in wissenschaftlichen Studien häufiger eingesetzt (Eichhorn ME, 2002) (Langer S, 2004), jedoch wurde bereits 1999 mit CFDA-SE angefärbten Thrombozyten erfolgreich eine Thrombozyten-Endothel-Interaktion in der retinalen Mikrozirkulation nachgewiesen (Tsujikawa A, 1999).

Langer et al (Langer S, 2004) beschäftigten sich in einer Studie mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation und deren Anfärbung zum Zweck der transdermalen Visualisierung. Sie kamen zu dem Schluss, dass keine ihrer untersuchten Farbstoffe eine ausreichende Fluoreszenzintensität aufwies und dabei keine künstliche Aktivierung hervorrief. Das in dieser Studie verwendete CFDA-SE war nicht unter den getesteten Substanzen.

Waldner et al (Waldner M, 2007) untersuchten in ihrer Studie eine modifizierte Anfärbetechnik von Thrombozyten und fanden, dass CFDA-SE die Thrombozyten ex vivo nicht aktiviert.

6.3.7 Plasmafärbung

Zur Visualisierung der Kapillarperfusion wurde das Plasma kontrastiert. Als Farbstoff wurde FITC-Dextran (Fluoresceinisothiocyanate-Dextran), ein fluoreszierender Farbstoff, der sein Absorptionsmaximum bei 495 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm hat, gewählt. Dieser Farbstoff wird in den meisten intravitalmikroskopischen Studien der mikrovaskulären Perfusion eingesetzt, wie beispielsweise an den Lungen (Tabuchi A, 2008) der Leber (Sherman IA, 1996) oder der Skelettmuskulatur (Alsip NL, 1996). FITC-Dextran wurde über einen Katheter in der Vena femoralis superficialis in der rechten Leiste appliziert. Die Plasmafärbung musste zeitlich nach den Videoaufnahmen der Thrombozytenfärbung verabreicht werden, da sowohl CFDA-SE als auch FITC dieselben Absorptions- und Emissionsmaxima haben.

6.3.8 Computergesteuerte Auswertung

Alle Analysen erfolgten off-line mit Hilfe von CapImage. CapImage ist ein computergestütztes System zur Videoanalyse dynamischer Kapillarmikroskopie, welches bereits vor

über zehn Jahren beschrieben wurde (Klyscz T, 1997) und seither Anwendung findet (Virgini-Magalhães CE, 2006). Von den zahlreichen Funktionen, die dieses Programm bietet, kam bei uns die Bestimmung der Anzahl adhärenter und fließender Thrombozyten und der Kapillardichte und -durchmesser zur Anwendung. Dabei wurden jeweils fünf Gesichtsfelder aus Lappenzentrum und -peripherie und Leistenzentrum und -peripherie ausgewertet, und daraus das arithmetische Mittel berechnet.

6.4 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

6.4.1 Zeiten und Intervalle primärer und sekundärer Ischämie

Unsere experimentell ermittelte sekundäre Ischämiezeit, bei der mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Thrombose entstand, lag bei 35 Minuten. In der Literatur sind spezieabhängig längere Zeiten sekundärer Ischämien beschrieben. Dabei wurden unter anderem als Versuchstiere außer Ratten auch Schweine verwendet.

Kerrigan et al (Kerrigan CL, 1984) hatten in einem Versuch mit Gewebelappen bei Schweinen eine sekundäre kritische Ischämiezeit von 7,2 Stunden ermittelt. Eine sichere sekundäre Ischämiezeit, bei der lediglich 10% Nekrosewahrscheinlichkeit bestand lag bei 4,7 Stunden. Verglichen dazu lag die durchschnittliche primäre Ischämiezeit bei 13,1 Stunden, wobei hier die sichere primäre Ischämiezeit, bei der eine 10%ige Nekrosewahrscheinlichkeit bestand, bei 7,0 Stunden lag.

Angel et al (Angel MF, 1990) untersuchten das kritische Zeitintervall der sekundären Ischämie bei axialen Lappentransplantaten bei Ratten. Dabei überlebten 56% der Lappen eine sekundäre Ischämie durch totale Stielobstruktion von 8 Stunden und 42% von 10 Stunden. Eine primäre Ischämie derselben Zeit überlebten 100% bzw. 67%. Durch eine venöse Obstruktion verursachte sekundäre Ischämie überlebten nach 3 Stunden nur 56% und nach 5 Stunden nur noch 8%.

Angel et al (Angel MF, 1991) untersuchten im Jahr 1991 an Ratten den Zusammenhang zwischen dem Zeitintervall der primären und sekundären Ischämie. Gewebelappen, welche eine sekundäre Ischämie von 12 und 36 Stunden nach primärer Ischämie durchmachten, hatten eine geringere Ischämietoleranz als solche, bei denen ein Zeitintervall von 72 Stunden zwischen primärer und sekundärer Ischämie lag. Deren Ischämietoleranz war ähnlich derer, die nur eine primäre Ischämie erfahren hatten. In einem weiteren Versuch wurden die Zeiten der primären Ischämie variiert. Ein Unterschied von nur 5 Minuten primärer Ischämie führte zu einem signifikanten Abfall in der Toleranz einer sekundären Ischämie.

Im selben Jahr untersuchten Babajanian et al (Babajanian M, 1991) ebenfalls die Zeitspannen primärer und sekundärer Ischämien an Gewebelappen bei Sprague-Dawley-

Ratten. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Überlebensrate signifikant mit dem Anstieg der primären und/oder sekundären Ischämiezeit und verringerten Reperfusionzeit abnahm. Eine längere primäre Ischämie und/oder kürzere Reperfusionzeit minderte die Toleranz des Gewebelappens bei einem ischämischen Ereignis.

Angel und Mitarbeiter (Angel MF, 1992) führten eine Studie mit freien Lappen bei Sprague-Dawley-Ratten durch, in dem sie primäre und sekundäre Ischämie durch mikrovaskuläres Abklemmen oder Durchtrennen und Anastomosieren der Gefäße durchführten. Beide Gruppen mit sekundärer Ischämie hatten ein signifikant geringeres Lappenüberleben verglichen mit den Gruppen, die ausschließlich eine primäre Ischämie erlitten hatten. Eine 5-stündige sekundäre Ischämie wurde von den Gewebelappen gering toleriert. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den Lappen, deren Gefäße abgeklemmt wurden und solchen, deren Gefäße abgeklemmt und durchtrennt/reanastomosiert wurden.

Mellow et al (Mellow CG, 1992) untersuchten 1992 die biochemischen Veränderungen im Gewebe während der sekundären Ischämie. Schäden durch freie Radikale, ein Schwund an freien Radikalfängern, ein Rückgang an ATP und eine Zunahme an Ödem kann Unterschiede beim Lappenüberleben bei partieller (venöse Obstruktion) und totaler (arteriovenöser Obstruktion) Ischämie verursachen. Sie stellten dabei nur geringe Unterschiede zwischen venöser und arteriovenöser Ischämie im Hinblick auf diese Parameter fest. Freie Radikale und Ödeme nahmen zu, ATP und freie Radikalfänger nahmen ab und zeigt somit, dass diese eine Rolle bei der sekundären Ischämie spielen.

Im Jahr 1994 zeigten Kerrigan et al (Kerrigan CL, 1994) in einem Versuch an Gewebetransplantaten bei Schweinen ein geringeres Lappenüberleben nach einer venös verursachten Ischämie im Vergleich zu einer arteriell verursachten. Auch sie haben eine Abnahme der Lappenüberlebensrate bei Zunahme der sekundären Ischämiezeit festgestellt.

6.4.2 Heparin

Vergleichbare Studien mit identischem Versuchsaufbau (Transplantation eines freien Gewebelappens, intraarterielle lokale Applikation von Heparin in den Lappen, experimentell erzeugte sekundäre Ischämie des Lappens, Intravitalmikroskopie mit angefärbten Thrombozyten und Plasma) finden sich in der Literatur nicht.

1991 hatten Wong et al (Wong L, 1991) den Effekt von systemisch appliziertem Heparin bei axialen/willkürlich gebildeten Hautlappen bei Ratten untersucht. Dabei wurde wie bei uns der venöse Abfluss vom Transplantatlappen für eine bestimmte Zeit unterbunden: bei der Kontrollgruppe 5-10 Stunden und bei der Heparin-Gruppe 8-15 Stunden. Die Ratten der Testgruppe erhielten Heparin bzw. die Ratten der Kontrollgruppe eine Kochsalzlösung unmittelbar vor Beginn der venösen Stase und stündlich während der venösen Stase. Das Überleben der Gewebetransplantate wurde sieben Tage lang beobachtet. In der Kontrollgruppe nahm die Überlebensrate kontinuierlich mit der Erhöhung der Zeitspanne der venösen Stase ab. Ab 10 Stunden venöser Stase hatte kein Lappen überlebt. In der mit Heparin behandelten Gruppe war ein Lappenüberleben nach 12 Stunden venöser Stase noch zu verzeichnen. Nach 13 Stunden venöser Stase gab es jedoch auch hier keine überlebenden Gewebelappen mehr.

Die systemische Gabe von Heparin hatte somit die Gewebetoleranz gegenüber einer venösen Stase von 10 auf 13 Stunden erhöht und die Überlebensrate der Lappen nach Reperfusion signifikant erhöht.

Im Unterschied zu Wong et al (Wong L, 1991) wurden in dieser Untersuchung die Lappen frei transplantiert und unsere Versuchstiere erhielten die Prüfsubstanzen lokal. Die Dauer der venösen Stase war bei uns auf 35 Minuten begrenzt. Unser Ziel war nicht, die maximal mögliche Dauer der venösen Stase zu testen. Wong et al hatten keine Intravitalmikroskopie durchgeführt.

Hjortdal et al (Hjortdal VE, 1994) hatten in einer Studie die venöse Ischämie in Gewebetransplantaten infolge mikrovaskulärer Thrombose bei Schweinen untersucht. Dabei wurde unter anderem die Anhäufung und Verteilung von Thrombozyten in den Lappen und die morphologischen Veränderungen in der mikrovaskulären Perfusion gemessen. Alle Lappen wurden einer primären Ischämie von zwei Stunden mit anschließender Reperfusion von zwei Stunden unterzogen. Die Hälfte der Lappen wurde einer sekundären Ischämie von sechs Stunden ausgesetzt. In Transplantatlappen mit sekundärer venöser Stase war die Anhäufung von Thrombozyten und Fibrinogen im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. Ein zweifacher Anstieg wurde vor der Reperfusion gemessen, ein dreifacher vier Stunden nach der Reperfusion. Eine elektronenmikroskopische histologische Auswertung zeigte eine Extravasation von Erythrozyten. Thrombozyten, Fibrin und Erythrozyten waren in erweiterten und teilweise zerstörten Kapillaren zu sehen. Die Verletzung nach venöser

Ischämie und Reperfusion ist nach Hjortdal et al (Hjortdal VE, 1994) assoziiert mit Thrombosen in der Mikrozirkulation und Veränderungen an Verbrauch an Gerinnungsfaktoren. Diesen Effekt konnten wir in unserer unbehandelten Vergleichsgruppe und der mit Voll-elektrolytlösung behandelten Vergleichsgruppe bestätigen. Wenn auch die Anzahl der adhärenen Thrombozyten erhöht und der Kapillardurchmesser erweitert war, bestand dennoch ein statistisch signifikanter Unterschied nur zur unbehandelten Vergleichsgruppe. Im Unterschied zu unserer intravitalmikroskopischen Auswertung erfolgte hier eine histologische Untersuchung und Analyse des Blutes. Um die Thrombozytenaktivität beurteilen zu können, wurden radioaktiv angereicherte Thrombozyten appliziert.

Birk-Sørensen et al (Birk-Sørensen L, 1997) hatten sich mit der Frage beschäftigt, ob eine Thrombose eine Schlüsselrolle bei entfernten ischämischen Lappenanteilen spielt und ob Heparin lokal i.a. appliziert das Lappenüberleben von entfernten ischämischen Lappenanteilen bei Schweinen verbessert. Hierbei wurden unter anderem radioaktiv markierte Thrombozyten intravenös appliziert und deren Verteilung gemessen. Es werden zwei Arten von ischämischen Schäden unterschieden: eine Ischämie im gesamten Lappen bei Transplantation freier Gewebelappen und eine Ischämie in der Peripherie von zu groß gewählten Gewebelappen. Letzteres wurde von Birk-Sørensen et al gewählt. Als Kontrolllappen wurden kleinere nicht ischämische Lappen gewählt. In ihrer histologischen Auswertung haben Birk-Sørensen et al herausgefunden, dass Thrombosen keinen wesentlichen Faktor bei der Ischämie von entfernten Gewebe- oder Hautlappenanteilen an der Grenze von vitalem zu ischämischem Gewebe darstellen und dass Heparin ein Überleben der entfernten Lappentransplantate nicht verbesserte. Stattdessen schien eine selektive Akkumulation von korpuskulären Elementen im ischämischen Teil des Lappens stattzufinden. Dabei waren entgegen den Erwartungen im venösen Teil vermehrt Thrombozyten statt Fibrinogen vorzufinden, auf die das applizierte Heparin jedoch keine Wirkung zeigte. Birk-Sørensen et al (Birk-Sørensen L, 1997) führten dies auf eine andere Formation der Thrombozyten als einen Thrombus zurück. Zur Kontrolle des i.a-applizierten Heparins wurde die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) in venösen Blutentnahmen bestimmt. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Heparingabe festgestellt.

Die Ursache der Ischämie ist in dieser Studie eine andere als in unserem Versuch, da der verminderte Blutfluss nicht durch Aufstauung wie bei uns, sondern durch verminderte

oder fehlende Blutversorgung entstand. Dennoch bewirkt die venöse Stase ebenfalls eine Akkumulation von Thrombozyten. Thrombozyten wurden radioaktiv markiert, um in der nachfolgenden Auswertung szintigraphisch messbar zu werden. Die Markierung und Auswertung der Thrombozyten unterschied sich somit von unserem Konzept.

Nachdem bereits in früheren Studien gezeigt wurde, dass Heparin gegen Reperfusionsschäden durch einen direkten Effekt am mikrovaskulären Endothel schützt, das unabhängig von der systemischen Gerinnung ist, hatten Kirschner et al (Kirschner RE, 1999) eine entsprechende Studie durchgeführt. Hierbei sollte die Rolle einer lokalen Applikation von Heparin auf das Überleben von Gewebelappen bei Sprague-Dawley-Ratten nach sekundärer Ischämie und Revaskularisation untersucht werden. Bei allen Versuchstieren folgte nach zweistündiger arteriovenöser Ischämie eine 20-stündige Reperfusion. Die Lappen waren anschließend einer sechsstündigen sekundären venösen Ischämie ausgesetzt, gefolgt von einer Anastomosenrevision (mit Thrombektomie) und Reperfusion. Eine Gruppe erhielt keine weitere Therapie, eine zweite Gruppe eine systemische Heparin-Applikation und eine dritte Gruppe eine topische Applikation von Heparin nach freier Lappentransplantation. Sieben Tage überlebten alle Lappen nach lokaler Applikation, in den beiden anderen Gruppen jeweils nur ca. 60%. Somit fand sich ein signifikantes Lappenüberleben nach einer lokalen Heparin-Applikation.

Diesem Ergebnis der lokalen Heparin-Applikation mit einer 100%-Überlebensrate steht unser Ergebnis einer 78%-Überlebensrate gegenüber. Unser Vorgehen unterschied sich von Kirschner et al (Kirschner RE, 1999): zuerst lokale Heparin-Infusion, dann venöse Stase von 35 Minuten. Auch hatten wir die Anastomose nicht revidiert. Kirschner et al führten keine Intravitalmikroskopie durch, am Ende des Versuches wurde eine histologische Untersuchung des Gewebes durchgeführt.

Mögliche Wirkungen/Mechanismen von Heparin

Mögliche Wirkungen von Heparin sah man früher in der antikoagulatorischen Aktivität (Saliba MJ, 1976), (Smith DR, 1969), (Wright JG, 1988), ebenso wie in der nicht-antikoagulatorischen Aktivität (Kirschner RE, 1999), in Abhängigkeit der Dosierung. Des Weiteren sind antiinflammatorische Eigenschaften (Carr J, 1979) durch Verhinderung einer Beschädigung durch Histamin, Serotonin und Bradykinin sowie antithrombotische Effekte (Hiebert LM, 1976), (Hiebert LM, 1989) durch Behinderung der Anbindung von

Thrombin an das Endothel möglich. Weitere Wirkungen des Heparins sind abgeschwächte postischämische Endothel-Dysfunktionen (Sternbergh WC, 1993), eine signifikant reduzierte postischämische mikrovaskuläre Permeabilität und Akkumulation von Wasserstoffionen (Hobson RW, 1988) und Verhinderung einer Beschädigung durch freie Sauerstoffradikale (Nillson VA, 1993), (Oyanagui Y, 1990). Dies ist ein Effekt, der aufgrund der Fähigkeit der Freisetzung extrazellulärer Superoxid-Dismutase vom Endothel herrührt (Oyanagui Y, 1990). Heparin verhindert ebenso durch freigesetzte Superoxid-Dismutase-Inhibitoren eine postischämische Leukozyten-Adhäsion am Endothel (Becker M, 1994) und hemmt durch endotheliale NO-Synthese die Neutrophilenadhäsion in der Mikrozirkulation (Minami M, 1995), (Li JM, 1996).

6.4.3 rtPA

Wie bei Heparin sind auch für rtPA vergleichbare Studien nicht publiziert.

Bereits 1989 beschrieben Fudem et al in einem Fallbericht (Fudem GM, 1989) eine Thrombolyse einer vermuteten Anastomosenthrombose in einem freien Lappentransplantat mit tPA in Verbindung mit Heparin. Die tPA-Infusion musste aufgrund einer spontanen Blutung gestoppt werden und wurde durch Heparin ersetzt. Der Lappen konnte gerettet werden.

Romano et al (Romano JE, 1989) beschrieben im selben Jahr in einem Kaninchen-Versuch den thrombolytischen Effekt von tPA in einem mikrovaskulären Modell. Sie fanden, dass die lokale Infusion von tPA effektiv Thrombosen, die bei einer venösen mikrovaskulären Anastomose auftreten, lysiert, ohne signifikant die systemische Fibrinolyse zu aktivieren.

Stassen et al (Stassen JM, 1995) sahen die chirurgischen Revisionen bei mikrovaskulären Thrombosen als nicht ausreichend an. Oft wurden pharmakologische Zusätze für die Prävention oder gelegentlich die Behandlung solcher mikrovaskulärer Thrombosen verwendet. Bei thrombolytischen Substanzen zur Lyse bereits bestehender Thromben existiert die Angst einer unkontrollierbaren Blutung. Eine lokale Applikation könnte die systemischen Komplikationen reduzieren. Stassen et al (Stassen JM, 1995) hatten diese Technik bereits erfolgreich mit rtPA zur Lyse einer arteriellen Thrombose angewendet.

Rohrich et al (Rohrich RJ, 1996) wandten in einer Studie mit Kaninchen (n=16 in Versuchsgruppe) humanes tPA als lokale Infusion über einen Zeitraum von 24 Stunden bei einem erprobten Thrombose-Modell mittels einer arteriellen Transplantat-Umstülpung der Intima und Adventitia (sogenanntes inversion graft) an. Dabei zeigte sich weder in der Versuchs- noch in der Kontrollgruppe eine signifikante klinische Blutung oder eine Veränderung der Gerinnungsparameter in den von humanem tPA perfundierten arteriellen Gefäßen. Elektronenmikroskopisch konnte in den Arterien der Versuchsgruppe auf einen Rückgang oder eine Prävention weiterer Thrombozytenaggregationen und -adhäsionen gezeigt werden. Rohrich et al (Rohrich RJ, 1996) interpretierten dieses Ergebnis als offensichtliche klinische Auswirkung bei der Prävention oder Umkehrung mikrovaskulärer Thrombosen bei der freien Gewebetransplantation.

Trotz der enormen Fortschritte in der mikrovaskulären Technik und chirurgischer Fähigkeiten ist die Anastomosenthrombose ein häufiges Problem. Thrombolytische Medikamente wie Urokinase, Streptokinase und Thrombolytin waren bereits eingeführt, haben jedoch unerwünschte Nebenwirkungen auf die systemische Hämostase. Atiyeh et al (Atiyeh BS, 1999) experimentierten 1999 mit Injektionen von rtPA lokal intraarteriell bei arterieller Thrombose, intravenös bei venöser Thrombose und in Weichteilgewebe je nach Lokalisation der Thromben bei drei Patienten nach Replantationschirurgie. Sie vermuteten, dass rtPA eine Rolle beim mikrovaskulären Gewebetransfer bei der Prävention oder Rettung freier Gewebelappen spielt.

Da tPA das potenteste und sicherste Fibrinolytikum im klinischen Gebrauch darstellt, haben Krapohl et al (Krapohl BD, 2000) im Jahr 2000 eine Studie mit Ratten durchgeführt, die tPA bei Skelettmuskellappen nach thrombogenetischem Stimulus einsetzte. Bis zu diesem Zeitpunkt mangelte es an kontrollierten Studien mit tPA im Bereich Mikrochirurgie und freier Gewebetransplantation. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass tPA lokal appliziert signifikant die kapillare Perfusion nach thrombogenetischem Insult verbesserte und somit die Lappen-Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen konnte.

Bonde et al (Bonde CT, 2004) setzten bei zwei Patienten mit jeweils einem freien Lappen-transplantat beim Auftreten einer venösen Thrombose an der venösen Anastomose erfolgreich systemisch und lokal intraarteriell rtPA begleitend mit Heparin und Prostazyklin

nach der chirurgischer Revision des Thrombus mit anschließendem No-Reflow-Phänomen ein.

Im Jahr 2006 haben Tran et al (Tran NV, 2006) Erfahrung mit subkutaner Applikation von rtPA bei der Rettung eines Myokutanlappens gemacht, nachdem Atiyeh et al (Atiyeh BS, 1999) 1999 bereits damit positive Erfahrung gemacht hatten. Eine manuelle Thrombektomie führte in einem freien Myokutanlappen nicht zur Aufrechterhaltung des venösen Flusses. Eine i.a. Injektion von rtPA hingegen ermöglichte den venösen Fluss. Trotz anschließender postoperativer Aspirin- und Heparintherapie erfuhr der Lappen eine weitere venöse Thrombose, woraufhin dieselbe Therapie folgte. Schließlich führte eine subkutane rtPA-Applikation zum Erfolg.

Rinker et al (Rinker BD, 2007) hatten im Jahr 2007 alle Daten von Patienten mit freien Lappentransplantaten zwischen den Jahren 2000 und 2005 untersucht, um Aussagen über Indikation, Dosis, Effizienz und Sicherheit des Einsatzes von rtPA zu machen, da davon bislang noch nie berichtet wurde. 275 Lappentransplantate wurden dabei untersucht. Bei 22 Fällen davon lag eine Thrombose vor, von denen 15 mit rtPA behandelt wurden. 67% der rtPA behandelten Lappen konnten gerettet werden, im Gegensatz zu 29% bei den nicht-rtPA-behandelten Lappen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die isolierte Perfusion von rtPA bei der Rettung freier Lappentransplantate effektiver ist, als der alleinigen Revision der Anastomose.

Casey et al (Casey WJ 3rd, 2007) führten eine retrospektive Studie durch, um die Effizienz intraarterieller Infusion von tPA bei freien Lappentransplantaten nach venöser Thrombose zu untersuchen. Zwischen 2003 und 2006 wurden bei den durchgeführten 122 freien Lappentransplantaten eine arterielle und elf venöse Thrombosen registriert. Alle venösen Thrombosen konnten mit tPA gerettet werden, obwohl eine davon eine zweite venöse Revision aufgrund einer weiteren Thrombose benötigte. Somit kann intraarteriell appliziertes tPA als effektiver Zusatz bei der Behandlung von mikrochirurgischen venösen Thrombosen betrachtet werden und erhöht die Rate der geretteten Anastomose-Komplikationen.

Aktivierung der Fibrinolyse (Estler C-J, 2007)

Ein Fibrinnetzwerk löst selbst die eigene Proteolyse aus. Von Endothelzellen produziertes tPA, dessen Freisetzung u.a. durch vasoaktive Substanzen wie den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Adrenalin, Desmopressinacetat oder Thrombin induziert werden kann, bindet zusammen mit Plasminogen an Fibrin. Der entstehende Multikomponenten-Enzymkomplex (tPA-Enzym, Fibrin=Cofaktor, Plasminogen=Substrat) führt zur effektiven Plasminbildung, die auf den Wundheilungsort beschränkt bleibt.

Thrombin als Kofaktor bei tPA bei der Fibrinolyse

Thrombin wirkt auf Thrombozyten (Packham MA, 1978) und Fibrinolyse (Murano G, 1980) und hierdurch auf die Thrombusformation. Levin et al (Levin EG, 1984) haben den Effekt von Thrombin auf die Ausschüttung von tPA aus menschlichen Endothelzellen untersucht. Dabei haben sie herausgefunden, dass mit einer Zeitverzögerung von sechs Stunden nach Thrombingabe ein Anstieg der tPA-Ausschüttung aus Endothelzellen stattfindet. Es scheint zunächst nicht zusammenzupassen, dass dasselbe Molekül, das die Thrombusformation unterstützt, eine Ausschüttung eines Plasminogen-Aktivators bewirken kann, welches die Hämostase gefährdet. Das Sechs-Stunden-Verzögerungsintervall führt dabei offensichtlich zum zunächst notwendigen Schutz der Hämostase.

In unserem Versuch wird keine Thrombinzugabe zur zeitverzögerten tPA-Ausschüttung angewandt. Dem vorhandenen Thrombin wird rtPA zugegeben, so dass dieses Verzögerungsintervall umgangen wird und keine Behinderung der Hämostase eintritt.

6.5 Bedeutung der Ergebnisse

6.5.1 Mechanismen primärer und sekundärer Ischämie

Die primäre Ischämie ist definiert als die Zeit von der Hebung eines Gewebetransplantates bis zu dessen Reperfusion. Nach Wiederherstellung des arteriellen Zustroms im Gewebetransplantat kann es zu einem „No-Reflow-Phänomen“, also einer postischämischen ausbleibenden Reperfusion, so dass der kapilläre nutritive Blutfluss herabgesetzt ist und somit ein Verlust des Gewebetransplantats einhergehen kann. Zahlreiche Untersuchun-

gen zur deren Ursachen und deren Vermeidung wurden dazu in den vergangenen Jahrzehnten gemacht. (Harder Y, 2008) (Scholz T, 2008), (Menger MD, 2003), (Fitzal F, 2001) (Calhoun KH, 1999) (Frick AF, 1993) (Mellow CG, 1990)

Aber nicht nur eine primäre Ischämie kann Ursache des Verlust eines Gewebetransplantats darstellen, sondern auch die sekundäre Ischämie.

Die sekundäre Ischämie stellt das Intervall zwischen dem postoperativen thrombotischen Verschluss eines freien Gewebelappens und seiner erfolgreichen Revaskularisation dar.

In unserem Experiment haben wir durch das Abklemmen des venösen Systems einen venösen Gefäßverschluss durch zum Beispiel einen Hämatomdruck oder Sekundärheilungsprozesse simuliert und dabei den arteriellen Zufluss gewährleistet. Da der venöse Blutabfluss aus dem Lappen nur über eine einzige anastomosierte Vene möglich ist, staut sich das arteriell ankommende Blut unweigerlich im Lappen an. Im angestauten Gefäßsystem wird das Gerinnungssystem aktiviert, so dass eine Thrombose entstehen kann. (Hjortdal VE, 1994), (Henne-Bruns D, 2003) Wir konnten an einigen Lappen der Kontrollgruppen makroskopisch eine akut venöse Stauung mit disseminierter livider Verfärbung als Zeichen einer venösen Stauung feststellen. Mikroskopisch waren in manchen Gesichtsfeldern nur partiell Kapillaren mit FITC-Dextran perfundiert (kapillares No-Reflow). Dies zeigt, dass generell ein arterieller Zufluss möglich war. Einige Kapillaren zeigten eine negative Kontrastierung. Die Kapillaren waren erst durch das umliegend heller erscheinende Gewebe sichtbar. Dies kann aufgrund des venösen Aufstaus mit konsekutiver Ruptur der Kapillarwand, Übertritt von Erythrozyten, FITC-Dextran und Ausbildung eines Gewebeödems entstehen. Ödembildung und Extravasation wurde bereits bei Hjortdal et al (Hjortdal VE, 1994) und Kerrigan et al (Kerrigan CL, 1994) als Zeichen einer sekundären venösen Ischämie beschrieben. Auch in Erwägung ziehen sollte man eine Erhöhung des Filtrationsdrucks im arteriellen Kapillarsystem bei venöser Abflussstörung mit erschwerter venöser Reabsorptionfähigkeit der Gewebsflüssigkeit. Dass gebietsweise die Kapillaren mikroskopisch nicht nachweisbar waren kann aber auch dadurch entstanden sein, dass das FITC-Dextran diese Gefäße aufgrund des Aufstaus oder aufgrund des Vorhandenseins von Mikrothromben in den Kapillaren über den arteriellen Zufluss erst gar nicht mehr erreicht hat. Einige Kapillaren zeigten einen vergrößerten Durchmesser. Bei einer Stase ist der Blutfluss verlangsamt oder aufgehoben. Der Sauerstoffdruck verringert sich, es folgt ein anaerober Metabolismus und pH-Abfall. Die Gefäße reagieren mit Dilatation. Nach

einer Zeit stirbt die Gefäßmuskulatur der kleinen Arterien ab, es kommt zu einer passiven Dilatation (Birk-Sørensen L, 1997).

Dass eine reduzierte ischämische Toleranz bei freien Transplantatlappen mit einem beeinträchtigten Blutfluss in der Haut zu erklären war, stellten auch He et al (He W, 1998) 1998 bei einem Versuch mit freien und gestielten Transplantatlappen bei Schweinen fest.

6.5.2 Heparin

Heparin ist allgemein als weitverbreitetes Antikoagulans bekannt, das die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin verhindert. Es ist bekannt dafür, Appositionsthrombusbildung zu verhindern. Wenn es systemisch verabreicht wird, kann es ein erhöhtes Risiko hämorrhagischer Komplikationen verursachen. Der Effekt von Heparin ist kontrollierbar über die PTT. Streptokinase und Urokinase, die schon länger im Einsatz sind, haben den Nachteil allergische Reaktionen hervorzurufen (Bonde CT, 2004).

In unseren Untersuchungen hat Heparin die höchste Überlebensrate freier mikrovaskulärer Gewebetransplantate gezeigt. Es besteht ein signifikanter Unterschied bei der Vitalität im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen A und B, sowie bei der funktionellen Kapillardichte im Lappen zu beiden Kontrollgruppen, beim Kapillardurchmesser im Lappen zur Kontrollgruppe A und der Anzahl durchflossener Thrombozyten im Lappen im Vergleich zur Kontrollgruppe A. Bei der makroskopischen Beurteilung zeigten sich in der mit Heparin behandelten Gruppe 77,8% vital.

Eine höhere funktionelle Kapillardichte, in der auch ein Fluss nachweisbar ist, führt zu einem besser mit Sauerstoff versorgten Lappen. Die Perfusion nutritiver Kapillaren garantiert eine adäquate Sauerstoffbelieferung des Gewebes und ist daher von essentieller Bedeutung für das Überleben des Organs und dessen Funktion (Menger MD, 1997).

Der Kapillardurchmesser in den Lappen der Kontrollgruppe A war signifikant größer im Vergleich zu den Lappen der mit Heparin behandelten Gruppe.

Es ist denkbar, dass bei freiem arteriellen Zufluss und fehlendem venösem Abfluss, in unserem Fall durch die künstlich erzeugte venöse Stase, der Druck im Kapillargefäßsystem des Transplantates steigt. Eine Ödementstehung im Gewebe mit intravaskulärer Hämokonzentration mit Endothelzellschwellung führt zu einer Einengung des kapillären Lumens

(Menger MD, 1997), (Menger MD, 2003), (Fitzal F, 2002). Durch den erhöhten Filtrationsdruck im arteriellen Kapillarsystem und der verminderten Reabsorptionsfähigkeit im venösen Kapillarsystem wird die Ödembildung verstärkt. In unseren Versuchen sind die Kapillardurchmesser der wenigen sichtbaren Kapillaren bei den Lappen der Kontrollgruppe A signifikant größer, was mit der in der Literatur häufig beschriebenen zunehmenden Einengung der Kapillarlumen nicht konform geht. Bei (Frick A 1999) wurden jedoch nach sekundärer venöser Stase ebenfalls wie bei uns maximal dilatierte Kapillaren beschrieben. Er sieht eine mögliche Erklärung im erhöhten Perfusionsdruck infolge der venösen Stase. Auch (Schmitz V, 2008) beschreibt bei vaskulären Veränderungen infolge Ischämie und Reperfusion unter anderem einen vergrößerten Kapillardurchmesser in den peritubulären Kapillaren der Niere.

Die Anzahl fließender Thrombozyten, die im Vergleich zur Kontrollgruppe A bei der mit Heparin behandelten Gruppe signifikant erhöht war, korreliert mit der signifikant erhöhten Kapillardichte. Je höher die Anzahl der fließenden Thrombozyten, desto weniger Thrombozyten sind wandadhärent.

Die Anzahl adhärenter Thrombozyten im Lappen zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den beiden Kontrollgruppen. Aronson et al stellten bei einer Studie (Aronson DL, 1985) von venösen Thrombosen bei Kaninchen fest, dass trotz aktivierter gefäßwandadhärenter Thrombozyten, das Blut über einen Zeitraum von 30 Minuten flüssig blieb. In unserem Versuch wurde eine Adhärenz von 60 sec gemessen. Ein eventuelles Weiterfließen nach Ablauf dieses Zeitraums blieb dabei unberücksichtigt. Auch wurde die Anzahl adhärenter Thrombozyten nicht im Verhältnis zur Kapillardichte gemessen. Die Kapillardichte in der mit Heparin behandelten Gruppe war signifikant höher im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache sind deutlich mehr Thrombozyten pro Strecke in den Vergleichsgruppen adhären.

Mechanismen der Adhärenz der Thrombozyten (Riede UN, 2004):

- Ein Abscheidungsthrombus ist ein durch Thrombozytenabscheidung an geschädigtem Gefäßbezirk im strömenden Blut entstandener Thrombus.
Kommt ein geschädigter Endothel-/Gefäßbezirk mit strömendem Blut in Kontakt, so scheiden sich auf ihm Thrombozyten ab, aggregieren und gehen irreversibel in eine

visköse Metamorphose über. Die damit verbundene Thrombozytorrhexis setzt Faktoren frei, die das plasmatische Gerinnungssystem aktivieren, so dass sich über dem primären Plättchenthrombus Fibrin abscheidet. In den Maschen des Fibrinnetzes verfangen sich Erythrozyten und Leukozyten, die das Volumen des Thrombus vergrößern. Der in den Blutstrom hineinragende Thrombus löst Turbulenzen aus, die weitere Abscheidungen von Plättchen, Fibrin und Blutzellen provozieren.

- Ein Gerinnungsthrombus ist ein in stagnierender Blutsäule entstandener Thrombus. Im nichtzirkulierenden Blut entwickelt sich früher oder später eine Hypoxidose, wobei aus den geschädigten Thrombozyten gerinnungsaktivierende Substanzen freigesetzt werden, so dass schließlich Fibrin ausfällt. Auf diese Weise gerinnt das Blut, ohne dass sich besondere lokale Anreicherungen von Thrombozyten oder Fibrin entwickeln können, wie sie einen Abscheidungsthrombus charakterisieren.

Es entsteht ein Thrombus, der die gleiche homogene rote Farbe hat, wie das Blut. Ein Fibrinnetz hält ihn dürrig zusammen. Er ist spröde und wenig elastisch, er ist dünn und flottiert ins Gefäßlumen, wird leicht losgerissen und als Embolus verschleppt.

- Ein gemischter Thrombus ist ein in Form langer Venenthrombus und besteht aus einem oder mehreren Abscheidungsthromben und dazwischenliegende und / oder angehefteten Gerinnungsthromben bestehen.

In unseren Versuchen war in der mit Heparin behandelten Gruppe die Anzahl der adhärenen Thrombozyten nicht signifikant höher als in den beiden Kontrollgruppen. Durch die venöse Stase entstehen Gerinnungsthromben in der stagnierenden Blutsäule, in der sich keine auffallende Anzahl an Thrombozyten anreichert. Eine größere Thrombozytenaggregation wie bei Abscheidungsthromben, war nicht nachweisbar.

Der Heparin-AT III-Komplex inaktiviert zahlreiche Gerinnungssysteme (Faktoren Xa, XIIa, XIa, IXa und Thrombin) und verhindert somit die Entstehung eines Gerinnungsthrombus (Karow T, 2006).

Antioxidative Prozesse:

Die Antikoagulation mit Heparin verbessert den thrombophilen Zustand und verhindert eine Appositionsthrombose. Daneben könnten allerdings auch antioxidative Prozesse im Zusammenhang mit Heparin eine Rolle spielen.

Oyanagui et al (Oyanagui Y, 1990) haben in einer Untersuchung an Mäusen gefunden,

dass die ischämische Ödembildung durch Gabe von Heparin durch Erhöhung von extrazellulärer Superoxid-Dismutase (EC-SOD) verringert wird. Von den drei Typen von EC-SOD hat EC-SOD-A keine und EC-SOD-B nur geringe Bindungsaffinität zu Heparin und dem Endothel. Hingegen wird von EC-SOD-C angenommen, dass es Blutgefäße vor Sauerstoffradikalen schützt, die von anhaftenden neutrophilen Granulozyten oder aktivierter Xanthinoxidase (XOD) produziert werden. EC-SOD-C hat eine starke Affinität zu Heparinoiden. Intravenöse Injektionen von Heparin (2000 U/kg KG) entfernt schnell gebundenes EC-SOD-C von Zellen und bedeckt damit Blutgefäßoberflächen, um diese vor oxidativem Stress zu schützen. Die Ischämie-Reperfusion bei Mäusepfoten zeigte bei dosisabhängiger Heparin-Gabe eine verminderte Ödembildung bei gleichzeitig angestiegener Plasma-SOD-Aktivität. Heparin hat einen Anstieg der Plasma-SOD-Aktivität um das 2,2 bzw. 5,2-fache bei Mäusen und Menschen bewirkt. Oyanagui et al führen die verminderte Ödembildung hierauf zurück. Heparin kann die Ausschüttung von EC-SOD-C als Enzym-Heparin-Komplex ins Plasma bewirken.

Bei einem der beiden nekrotischen Gewebetransplantate zeigten sich in der IVM Ergebnisse wie bei den Tieren der Kontrollgruppe A: eine deutlich reduzierte Kapillardichte, ein erhöhter Kapillardurchmesser, eine deutlich erhöhte Anzahl adhärenter Thrombozyten und keine fließenden Thrombozyten. Der zweite nekrotische Lappen zeigte sich konträr: die Eigenschaften unterschieden sich nicht von den vitalen Lappen.

Ob sich nach Abklingen der Wirkung des Heparins eine Thrombose mit hämodynamischen Auswirkungen entstanden ist, kann nicht nachgewiesen werden, da die IVM nur kurzzeitig nach der künstlich erzeugten sekundären Ischämie durchgeführt wurde. Die dosisabhängige Halbwertszeit von Heparin liegt bei 1 Stunde bei einer Applikation von 100IU/kg KG (Karow T, 2006).

Generell konnte gezeigt werden, dass lokal i.a. appliziertes Heparin die Überlebenswahrscheinlichkeit von freien Lappentransplantaten signifikant erhöht und dieses auch in den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie (Kapillardichte etc) nachvollzogen werden konnte.

Die Mehrzahl der Studien, die bereits in früheren Jahren durchgeführt wurden, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Heparin die Überlebensrate von freien oder gestielten Gewebelappen erhöht. Dies konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Auch eine direkte lokale Heparin-Applikation scheint wie bei Kirschner et al (Kirschner RE 1999)

vermehrt dazu beizutragen, ohne auf die systemische Koagulation Auswirkung zu haben. Bei Wong et al (Wong L 1991) hatte eine systemische Applikation von Heparin zumindest eine erhöhte Gewebetoleranz gegenüber einer venösen Ischämie ergeben. Da nicht klar ist, ob mögliche Unterschiede in der Pathophysiologie der Ischämie in der Peripherie überdimensionierter Lappen identisch ist mit derjenigen kompletter Ischämie bei freien Lappentransplantaten, könnte dies den Unterschied der Ergebnisse von Birk-Sørensen (Birk-Sørensen L 1997) mit unseren Ergebnissen erklären.

6.5.3 rtPA

Rekombinantes tPA zählt zur zweiten Generation thrombolytischer Substanzen. Es bindet direkt an das Fibrinmolekül und fördert die Plasminogenaktivierung und Fibrinolyse. Thrombolyse findet im Wesentlichen nur an diesem Ort statt und hat dadurch kaum systemische Wirkung. Auf diese Weise sollen sich Thromben innerhalb von zehn Minuten auflösen (Bonde CT, 2004). Als fibrinselektives Thrombolytikum induziert es jedoch an fibrinreparierten Gefäßen eine Blutung.

Die Überlebensrate freier mikrovaskulärer Gewebetransplantate in unserem Versuch lag bei der mit rtPA behandelten Gruppe bei 60% und war somit niedriger als bei der Heparin-Gruppe. Die Vitalität der Lappen unterschied sich zur unbehandelten Kontrollgruppe A statistisch signifikant, zur mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Hierbei kann die unterschiedliche Gruppengröße eine Rolle spielen.

Einen signifikanten Unterschied in der funktionellen Kapillardichte in den Lappen gab es im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen A und B. Die Kapillardurchmesser der Lappen war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe A signifikant erhöht, während bei der Anzahl adhärenter oder fließender Thrombozyten kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war.

Bereits zahlreiche Versuche mit (r)tPA in den vergangenen Jahren haben gezeigt, dass der Einsatz mit (r)tPA bei der Lyse von Thrombosen in Transplantatlappen erfolgreich war (Atiyeh BS, 1999) (Bonde CT, 2004) (Casey WJ 3rd, 2007) (Fudem GM, 1989) (Hayden RE, 1989) (Krapohl BD, 2000) (Rinker BD, 2007) (Romano JE, 1989) (Stassen JM, 1995), beim lokalen arteriellen Einsatz sogar ohne schwerwiegende Komplikationen wie intraabdominelle Blutungen oder Blutungen an den Transplantaten. Mögliche Wechselwirkungen bestehen in einem erhöhten Blutungsrisiko zusammen mit Cumarinen, oralen Antikoagulan-

tien, Thrombozytenaggregationshemmern, nichtfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin, oder anderen die Blutgerinnung hemmenden Arzneimitteln. Die Halbwertszeit von rtPA liegt zwischen 5 Minuten (www) und 18 Minuten (Karow T, 2006)

Bei zwei der vier nekrotischen Gewebetransplantate zeigten sich in der IVM eine Kapillardichte und ein Kapillardurchmesser, die sich letztlich nicht von denen der am Ende vitalen Gewebetransplantate unterschied. Die IVM wurde unmittelbar nach der künstlich erzeugten sekundären Ischämie durchgeführt. Eventuelle Veränderungen der Kapillardichte, Kapillardurchmesser, adhären und fließenden Thrombozyten im Verlauf konnten nicht beobachtet werden.

6.6 Schlussfolgerung

Trotz der in der Literatur beschriebenen bisherigen Erfolge mit rtPA, im Speziellen bei der lokalen i.a. Anwendung, ist unser Ergebnis dennoch weniger erfolgreich als in der mit Heparin behandelten Gruppe. Durch die nahezu lokale Wirkung ohne wesentliche systemische Nebenwirkungen wäre es durchaus denkbar, in weiterführenden Studien mit modifiziertem Versuchsprotokoll bessere Ergebnisse zu erzielen. Wenngleich auch eine deutliche Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion bzw. Abschwächung des Ischämie-Reperfusionsschadens durch sowohl Heparin als auch rtPA erzielt werden konnte. Selbst eine subkutane Applikation von rtPA war in einer Untersuchung von Tran et al (Tran NV, 2006) erfolgreich. Möglicherweise ist eine Kombination mehrerer Substanzen ein Schlüssel zum Erfolg. Laut Bonde et al (Bonde CT, 2004) gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass die zusätzliche Anwendung von Prostazyklin durch seine abschwächende Wirkung auf die Thrombozytenaktivität eine Rethrombose verhindern kann. Nach der rtPA-Applikation angewandt stellt Prostazyklin eine wirkungsvolle Ergänzung dar. Dass unsere Versuchstiere nur unmittelbar vor Erzeugung der sekundären venösen Stase die zu testenden Pharmaka erhalten hatten reicht möglicherweise nicht aus. Eine wiederholte Gabe oder Kombination könnte in klinischem Einsatz möglicherweise eine weitere Verbesserung des Ergebnisses bewirken.

RtPA ist theoretisch die effektivste Substanz um einen verschließenden Thrombus zu lösen (Bonde CT, 2004) ohne Auslösung einer allergischen Reaktion oder wesentlicher hä-

morrhagischer Komplikationen.

Heparin kann mit seiner antioxidativen Wirkung auf die Blutgefäßendothelien zu einem verminderten Gewebeödem beitragen. (Wang P, 1996)

7 Zusammenfassung

Große Haut-Weichteildefekte können durch ein Trauma oder eine Resektion von verändertem Gewebe entstehen und stellen immer wieder eine Herausforderung für die plastisch-chirurgische Defektdeckung dar. Freie Gewebetransplantate erfahren durch ihre Hebung eine primäre Ischämie, die nach der Anastomosierung zu einem „No-Reflow-Phänomen“ führen kann. Im weiteren postoperativen Verlauf kann es zu einer erneuten sekundären Ischämie infolge isolierter Thrombose, von Hämatomdruck oder Sekundärheilung der bedeckenden Weichteile kommen.

In der vorliegenden experimentellen Untersuchung wurde der medikamentöse Einfluss sowohl von Heparin als auch des Fibrinolytikums rtPA auf das Überleben frei transplan- tierter Lappen nach sekundärer venöser Stase untersucht.

Bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten (n=32) wurde von der Leiste ein 3 cm großer adi- pokutaner Lappen entnommen und mit freiem mikrochirurgischem Gefäßanschluss im Empfängergebiet an den Hals transplantiert. Die Tiere wurden in vier Gruppen randomi- siert: zwei Kontrollgruppen, eine unbehandelt, eine mit einer Vollelektrolytlösung, eine mit Heparin behandelte Gruppe und eine mit rtPA behandelten Gruppe. Am 1. postopera- tiven Tag erhielten die Tiere ihren jeweiligen Wirkstoff intraarteriell in den Lappen appli- ziert. Anschließend wurde durch Abklemmen der Lappenvene eine sekundäre venöse Stase von 35 Minuten experimentell erzeugt. Nach Beendigung der venösen Ischämie wurden den Tieren CFDA-SE-markierte Thrombozyten i.v. verabreicht, um nachfolgend intravitalmikroskopische Untersuchungen durchzuführen.

Die Analyse unserer Daten zeigte eine Verbesserung der nutritiven kapillären Perfusion und Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens sowohl durch die antikoagulatori- sche (und möglicherweise antioxidative Wirkung) Wirkung des Heparins als auch durch die fibrinolytische Wirkung des rekombinaten Gewebefibrinolytikers rtPA. Es bestand ein signifikanter Unterschied von Heparin und rtPA jeweils zu beiden Kontrollgruppen.

Da rtPA eine sehr effektive Substanz zur lokalen Lyse von Thromben darstellt, bei fehlen- den allergischen (wie bei Urokinase, Streptokinase) oder verminderten systemisch hä- morrhagischen (Heparin) Nebenwirkungen, kann rtPA im klinischen Alltag zur adjuvanten Therapie während und nach einer operativen Thrombektomie eingesetzt werden.

8 Literaturverzeichnis

Acland, R. 1972. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery*. Nov 1972, Bd. 72(5), S. 744-8.

Alonso de Lecinana M, Gutiérrez M, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. 2006. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke. *J Neurol Sci*. 25. Sep 2006, Bd. 247(2), S. 121-9.

Alsip NL, Schuschke DA, Miller FN. 1996. Microvascular responses in the skeletal muscle of the diabetic rat. *J Lab Clin Med*. Oct 1996, Bd. 128(4), S. 429-37.

Ames A, Wright M, Kowada JM, Thurston G, Majno G. 1968. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Amer J Pathol*. 1968, Bd. 52(2), S. 437-53.

Andersen M, Overgaard K, Meden P, Boysen G, Choi SC. 1999. Effects of citicoline combined with thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Stroke*. Jul 1999, Bd. 30(7), S. 1464-71.

Angel MF, Knight KR, Amiss LR, Morgan RF. 1992. Further investigation of secondary venous obstruction. *Microsurgery*. 1992, Bd. 13(5), S. 255-7.

Angel MF, Knight KR, Biavati MJ, Mellow CG, Wanebo J, Amiss LR, Morgan RM. 1991. Timing relationships for secondary ischaemia in rodents: the effect of arteriovenous obstruction. *J Reconstr Microsurg*. Oct 1991, Bd. 7(4), S. 335-7.

Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM. 1990. Secondary ischemia time in rodents: contrasting complete pedicle interruption with venous obstruction. *Plast Reconstr Surg*. May 1990, Bd. 85(5), S. 789-93; discussion 794-5.

Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM. 1989. The effect of deferoxamine on tolerance to secondary ischaemia caused by venous obstruction. *Br J Plast Surg*. Jul 1989, Bd. 42(4), S. 422-4.

Aronson DL, Thomas DP. 1985. Experimental studies on venous thrombosis: effects of coagulants, procoagulants and vessels contusion. *Thromb Haemost.* 17. Dec 1985, Bd. 54(4), S. 866-70.

Asai A, Sahani N, Ouchi Y, Martyn J, Yasuhara S. 2007. In vivo micro-circulation measurement in skeletal muscle by intra-vital microscopy. *J Vis Exp.* 2007, Bd. (4), S. 210.

Atiyeh BS, Hashim HA, Hamdan AM, Moucharafieh RS. 1999. Local recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) thrombolytic therapy in microvascular surgery. *Microsurgery.* 1999, Bd. 19(6), S. 265-71.

Babajanian M, Zhang WX, Turk JB, Weinberg H, Biller HF, Urken ML. 1991. Temporal factors affecting the secondary critical ischemia of normothermic experimental skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* Dec 1991, Bd. 117(12), S. 1360-4.

Barker JH, Hammersen F, Galla TJ, Bondà I, Zeller P, Menger MD, Messmer K. 1990. Direct monitoring of capillary perfusion following normovolemic hemodilution in an experimental skin-flap model. *Plast Reconstr Surg.* Nov 1990, Bd. 86(5), S. 946-54.

Becker M, Menger MD, Lehr HA. 1994. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to the venular endothelium. *Am J Physiol.* 1994, Bd. 267, S. H925-H930.

Birk-Sørensen L, Tromborg HB, Kerrigan CL, Solymoss S, Hjortdal VE. 1997. Sedimentation of formed elements in distally ischaemic flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* Sep 1997, Bd. 31(3), S. 203-11.

Bonde CT, Heslet L, Jansen E, Elberg JJ. 2004. Salvage of free flaps after venous thrombosis: case report. *Microsurgery.* 2004, Bd. 24(4), S. 298-301.

Bos, KE. 2000. Fifty years of plastic surgery in the Netherlands. VI. Microsurgery. *Ned Tijdschr Geneesk.* 27. May 2000, Bd. 144(22), S. 1037-43.

Burggraf D, Vosko MR, Schubert M, Stassen JM, Hamann GF. 2010. Different therapy options protecting microvasculature after experimental cerebral ischaemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 9. Mar 2010, Bd. 103(5).

Calhoun KH, Tan L, Seikaly H. 1999. An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-reflow. *Laryngoscope*. Apr 1999, Bd. 109, 4, S. 528-35.

Carr J. 1979. The anti-inflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E1. *Thromb Res*. 1979, Bd. 16, S. 507-516.

Casey WJ 3rd, Craft RO, Rebecca AM, Smith AA, Yoon S. 2007. Intra-arteriel tissue plasminogen activator: an effective adjunct following microsurgical venous thrombosis. *Ann Plast Surg*. Nov 2007, Bd. 59(5), S. 520-5.

Daniel RK, Taylor GI. 1973. Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses. A clinical technique. *Plast Reconst Surg*. Aug 1973, Bd. 52(2), S. 111-7.

D'Arpa S, Cordova A, Moschella F. 2005. Pharmacological thrombolysis: one more weapon for free-flap salvage. *Microsurgery*. 2005, Bd. 25(6), S. 477-80.

Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. 2002. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res*. Jul-Aug 2002, Bd. 39(4), S. 330-9.

Estler C-J, Schmidt H. 2007. *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. s.l. : Schattauer, 2007. S. 534.

Fagan SC, Nagaraja TN, Fenstermacher JD, Zheng J, Johnson M, Knight RA. 2003. Hemorrhagic transformation is related to the duration of occlusion and treatment with tissue plasminogen activator in a nonembolic stroke model. *Neurol Res*. Jun 2003, Bd. 25(4), S. 377-82.

Fitzal F, DeLano FA, Young C, Schmid-Schönbein GW. 2002. Early capillary no-reflow during low-flow reperfusion after hind limb ischemia in the rat. *Annals of Plastic Surgery*. Aug 2002, Bd. 49(2), S. 170-80.

Fitzal F, Valentini D, Mittermayr R, Wörseg A, Gasser IH, Redl H. 2001. Circulatory changes after prolonged ischemia in the epigastric flap. *J Reconstr Microsurg*. Oct 2001, Bd. 17(7), S. 535-43.

Frick A, Baumeister RG, Menger MD, Vollmar B, Wohllaib U, Wiebecke B. 1999. Secondary ischaemia in experimental free flaps – treatment by long acting prostacyclin analogues. *Br J Plast Surg*. Jul 1999, Bd. 52(5), S. 392-8.

Frick A, Baumeister RG, Wohllaib U. 1993. Free flap survival improved by prostacyclin analogues. *Microsurgery*. 1993, Bd. 14(7), S. 464-7.

Frick AF, Baumhauer A, Baumeister RG, Wiebecke B. 1993. Experimental studies of the no-reflow phenomenon with prostacyclin. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. Nov 1993, Bd. 25(6), S. 296-9.

Fudem GM, Walton RL. 1989. Microvascular thrombolysis to salvage a free flap using human recombinant tissue plasminogen activator. *J Reconstr Microsurg*. Jul 1989, Bd. 5(3), S. 231-4.

Gabriel A, Chaney N, Stephenson LL, Zamboni WA. 2001. Effect of total venous occlusion on capillary flow and necrosis in skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*. Aug 2001, Bd. 108(2), S. 430-3.

Germain MA, Legagneux J. 2001. Vascular microsurgery and progress of free flap surgery. *Ann Chir*. Dec 2001, Bd. 126(10), S. 960-8.

Haelewyn B, Risso JJ, Abraini JH. 2010. Human recombinant tissue-plasminogen activator (alteplase): why not use the 'human' dose for stroke studies in rats? *J Cereb Blood Flow Metab*. Mar 2010, Bd. 30(5), S. 900-3.

Harder Y, Amon M, Laschke MW, Schramm R, Rücker M, Wettstein R, Bastiaanse J, Frick A, Machens HG, Küntscher M, Germann G, Vollmar B, Erni D, Menger MD. 2008. An old dream revitalised: preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008, Bd. 61(5), S. 503-11.

Hauge EM, Balling E, Hartmund T, Hjortdal VE. 1997. Secondary ischemia caused by venous or arterial occlusion shows differential effects on myocutaneous island flap survival and muscle ATP levels. *Plast Reconstr Surg*. Mar 1997, Bd. 99(3), S. 825-33.

Hayden RE, McLear PW, Phillips JG, Dawsen SM. 1989. Thrombolysis with systemically administered t-PA in a new venous thrombosis model. *Laryngoscope*. Jan 1989, Bd. 99(1), S. 100-4.

Hayhurst JW, O'Brien BM. 1975. An experimental study of microvascular technique, patency rates and related factors. *Br J Plast Surg*. Apr 1975, Bd. 28(2), S. 128-32.

He W, Zhang J, Pang CY. 1998. Comparison of secondary ischemia tolerance between free skin flap and island skin flap raised on the buttock of the pig. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi*. Jan 1998, Bd. 14(1), S. 9-12.

Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B. 2003. *Chirurgie*. s.l. : Thieme, 2003, S. 146.

— . **2003.** *Chirurgie*. s.l. : Thieme, 2003, S. 1311.

— . **2003.** *Chirurgie*. s.l. : Thieme, 2003, S. 1306.

Hiebert LM, Jaques LB. 1976. The observation of heparin on endothelium after injection. *Thromb Res*. 1976, Bd. 8, S. 195-204.

Hiebert LM, McDuffie NM. 1989. The intracellular uptake and protracted release of exogenous heparins by cultured endothelial cells. *Artery*. 1989, Bd. 16, S. 208-222.

Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. 1994. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg*. Feb 1994, Bd. 93(2), S. 366-74.

Hobson RW, Wright JG, Fox D, Kerr JC. 1988. Heparinization reduces endothelial permeability and hydrogen ion accumulation in a canine skeletal muscle ischemia-reperfusion model. *J Vasc Surg*. 1988, Bd. 7(4), S. 585-590.

Jokuszies A, Niederbichler A, Meyer-Marcotty M, Lahoda LU, Reimers K, Vogt PM. 2006. Influence of transendothelial mechanisms on microcirculation: consequences for reperfusion injury after free flap transfer. Previous, current, and future aspects. *J Reconstr Microsurg*. Oct 2006, Bd. 22(7), S. 513-8.

Karow T, Lang-Roth R. 2006. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2006, S. 157-181.

Keck T, Banafsche R, Werner J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. 2001. Desmopressin impairs microcirculation in the donor pancreas and early graft function after experimental pancreas transplantation. *Transplantation*. Jul 2001, Bd. 72(2), S. 202-9.

Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. 1994. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg*. Jun 1994, Bd. 93(7), S. 1485-95; discussion 1496-7.

Kerrigan CL, Zelt RG, Daniel RK. 1984. Secondary critical ischemia time of experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. Oct 1984, Bd. 74(4), S. 522-6.

Kirschner RE, Xu J, Fyfe B, Chang B, Bucky LP. 1999. Salvage of free flaps after secondary venous ischemia by local delivery of heparin. *Ann Plast Surg*. May 1999, Bd. 42(5), S. 521-7.

Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. 1997. Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)*. Jun 1997, Bd. 42(6), S. 168-75.

Knox LK, Angel MF, Gamper T, Amiss LR, Morgan RF. 1996. Secondary ischemic tolerance improved by administration of L-NAME in rat flaps. *Microsurgery*. 1996, Bd. 17(8), S. 425-7.

Krapohl BD, Zins JE, Sienionow M. 2000. Improving microcirculation of Muscle flaps by tissue plasminogen activator in the rat cremaster muscle flap model. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. May 2000, Bd. 32(3), S. 187-92.

Langer S, Nolte D, Koeller M, Steinau HU, Khandoga A, Homann HH. 2004. In vivo visualization of platelet/endothelium cell interaction in muscle flaps. *Ann Plast Surg*. Aug 2004, Bd. 53(2), S. 137-40.

Lepore DA, Knight KR, Bhattacharya S, Ritz M, Robbins SP, Sieg P, Morrison WA, O'Brien BM. 1994. Drug mixture which improves survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps. *Microsurgery*. 1994, Bd. 15(10), S. 685-92.

Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA. 1984. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothel cells. *J Clin Invest*. Dec 1984, Bd. 74(6), S. 1988-95.

Li D, Luo J. 1997. Experimental study of prostacyclin on the survival of random skin flaps. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi*. Sept 1997, Bd. 13(5), S. 349-51.

Li JM, Hajarizadeh H, LaRosa CA, et al. 1996. Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg*. 1996, Bd. 37, S. 445-452.

Lidman D, Daniel RK. 1981. Evaluation of clinical microvascular anastomoses—reasons for failure. *Ann Plast Surg*. Mar 1981, Bd. 6(3), S. 215-23.

Linder A. 1959. Planen und Auswerten von Versuchen. *Birkhäuser*. 1959, S. 177.

Lipton HA, Jupiter JB. 1987. Streptokinase salvage of a free-tissue transfer: case report and review of the literature. *Plast Reconstr Surg*. Jun 1987, Bd. 79(6), S. 977-81.

Longstreet N, Lindley S, Benghuzzi H, Tucci M, Zhang F. 2009. The effects of deferoxamine on the survival of free flaps using the adult male rat as a model - biomed 2009. *Biomed Sci Instrum*. 2009, Bd. 45, S. 334-9.

Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Kromnach F, Messmer K. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 15. Jul 1998, Bd. 92(2), S. 507-515.

Mellow CG, Knight KR, Angel MF, Coe SA, O'Brien BM. 1992. The biochemical basis of secondary ischemia. *J Surg Res*. Mar 1992, Bd. 52(3), S. 226-32.

Mellow CG, Knight KR, Angel MF, O'Brien BM. 1990. The effect of thromboxane synthetase inhibition on tolerance of skin flaps to secondary ischemia caused by venous obstruction. *Plast Reconstr Surg*. Aug 1990, Bd. 86(2), S. 329-34.

Mellow CG, Knight KR, Angel MF, O'Brien BM. 1990. Effect of a thromboxane synthetase inhibitor UK-38,485 on the tolerance of skin flaps of primary ischaemia. *Aust N Z J Surg.* Apr 1990, Bd. 60(4), S. 293-7.

Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Thorlacius H, Rücker M, Vollmar B. 2003. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch Surg.* Oct 2003, Bd. 388(5), S. 281-90.

Menger MD, Rücker M, Vollmar B. 1997. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock.* Jul 1997, Bd. 8(1), S. 2-7.

Miller CW, Fowler JD. 1990. Applications of microvascular surgery. *Probl Vet Med.* Sep 1990, Bd. 2(3), S. 397-404.

Minami M, Yokokawa K, Kohno M, et al. 1995. Promotion of nitric oxide formation by heparin in cultured aortic endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995, Bd. 1, S. 5146-5147.

Miyamoto S, Takushima A, Okazaki M, Shiraishi T, Minabe T, Harii K. 2008. Free pectoral skin flap in the rat based on the long thoracic vessels: a new flap model for experimental study and microsurgical training. *Ann Plast Surg.* Aug 2008, Bd. 61(2), S. 479-80.

Murano G. 1980. A basic outline of blood coagulation. *Semin Thromb and Hemostasis.* 1980, Bd. 6, S. 140-161.

Neumann-Haefelin C, Brinker G, Uhlenkücken U, Pillekamp F, Hossmann KA, Hoehn M. 2002. Prediction of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy of clot embolism: an MRI investigation in rat brain. *Stroke.* May 2002, Bd. 33(5), S. 1392-8.

Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA. 2002. Thrombolytic treatment of clot embolism in rat: comparison of intra-arterial and intravenous application of recombinant tissue plasminogen activator. *Stroke.* Dec 2002, Bd. 33(12), S. 2999-3005.

Nilsson VA, Haraldsson G, Bratell S, et al. 1993. ESR-measurement of oxygen radicals in vivo after renal ischemia in the rabbit: effects of pretreatment with superoxide dismutase and heparin. *Acta Physiol Scand.* 1993, Bd. 147, S. 263-270.

Noever G, Brüser P, Köhler L. 1986. Reconstruction of heel and sole defects by free flaps. *Plast Reconstr Surg.* Sep 1986, Bd. 78(3), S. 345-52.

Oyanagui Y, Sato S. 1990. Heparin, a potent releasing agent of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD C), suppresses ischaemic paw oedema in mice. *Free Radic Res Commun.* June 1990, Bd. 9(2), S. 87-99.

Packham MA, Mustard TF, Kinlough-Rathbone RL. 1978. Role of thrombin in platelet function. [Buchverf.] Rodvien R Mielke CH. *Mechanisms of Hemostasis and Thrombosis.* Miami : s.n., 1978, S. 139-166.

Rasmussen RS, Overgaard K, Meden P, Boysen G. 2003. Thrombolytic and anticoagulation treatment in a rat embolic stroke model. *Acta Neurol Scand.* Sep 2003, Bd. 108(3), S. 185-92.

Renaud F, Succo E, Alessi MC, Legre R, Juhan-Vague I. 1996. Iloprost and salvage of a free flap. *Br J Plast Surg.* Jun 1996, Bd. 49(4), S. 245-8.

Riede UN, Werner M, Schäfer H-E. 2004. *Allgemeine und spezielle Pathologie.* Stuttgart : Thieme, 2004. S. 406-407.

Rinker BD, Stewart DH, Pu LL, Vasconez HC. 2007. Role of recombinant tissue plasminogen activator in free flap salvage. *J Reconstr Microsurg.* Feb 2007, Bd. 23(2), S. 69-73.

Robertson JH, Yang SY, Iga AM, Seifalian AM, Winslet MC. 2008. An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol.* Dec 2008, Bd. 89(6), S. 447-57.

Rohrich RJ, Handren J, Kersh R, Hergrueter CA, May JW Jr. 1996. Prevention of microvascular thrombosis with short-term infusion of human tissue-type plasminogen activator. *Plast Reconstr Surg.* Jul 1996, Bd. 98(1), S. 118-28.

Romano JE, Biel MA. 1989. Thrombolysis in microvascular surgery using tissue-type plasminogen activator. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* Nov 1989, Bd. 115(11), S. 1318-21.

Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. 2007. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jan 2007, Bd. 27(1), S. 14-20.

Röttger C, Madlener K, Heil M, Gerriets T, Walberer M, Wessels T, Bachmann G, Kaps M, Stolz E. 2005. Is heparin treatment the optimal management for cerebral venous thrombosis? Effect of abciximab, recombinant tissue plasminogen activator, and enoxaparin in experimentally induced superior sagittal sinus thrombosis. *Stroke.* Apr 2005, Bd. 36(4), S. 841-6.

Ruby LK, Greene M, Risitano G, Torrejon R, Belsky MR. 1984. Experience with epigastric free flap transfer in the rat: technique and results. *Microsurgery.* 1984, Bd. 5(2), S. 102-4.

Rücker M, Roesken F, Schäfer T, Spitzer WJ, Vollmar B, Menger MD. 1999. In vivo analysis of the microcirculation of osteomyocutaneous flaps using fluorescence microscopy. *Br J Plast Surg.* Dec 1999, Bd. 52(8), S. 644-52.

Ruhparwar A, Bara C, Kofidis T, Ruebesamen N, Karck M, Martin U, Haverich A. 2006. In vivo detection of integration of grafted cells after myocardial transplantation. *Zentralbl Chir.* Oct 2006, Bd. 131(5), S. 420-4.

Saliba MJ, Covell JW, Bloor CM. 1976. Effects of heparin in large doses on the extent of myocardial ischemia after acute coronary occlusion in the dog. *Am J Cardiol.* 1976, Bd. 37, S. 599-604.

Schmitz V, Schaser KD, Olschewski P, Neuhaus P, Puhl G. 2008. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *Eur Surg Res.* 2008, Bd. 40(1), S. 19-25.

Scholz T, Evans GR. 2008. Impact of hypertonic and hyperoncotic saline solutions on ischemia-reperfusion injury in free flaps. *Plast Reconstr Surg.* Jul 2008, Bd. 122(1), S. 85-94.

Serletti JM, Moran SL, Orlando GS, O'Connor T, Herrera HR. 1998. Urokinase protocol for free-flap salvage following prolonged venous thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* Nov 1998, Bd. 102(6), S. 1947-53.

Shalom A, Friedman T, Westreich M. 2007. The effect of postoperative aspirin on random pattern flaps in rats. *Am Surg.* Nov 2007, Bd. 73(11), S. 1126-8.

Shaw, WW. 1983. Microvascular free flaps. The first decade. *Clin Plast Surg.* Jan 1983, Bd. 10(1), S. 3-20.

Sherman IA, Dlugosz JA, Barker F, Sadeghi FM, Pang KS. 1996. Dynamics of arterial and portal venous flow interactions in perfused rat liver: an intravital microscopic study. *Am J Physiol.* Jul 1996, Bd. 271(1 Pt 1), S. G201-10.

Smith DR, Ducker TB, Kempe LG. 1969. Temporary intracranial vascular occlusion: effect of massive doses of heparin on brain survival. *J Neurosurg.* 1969, Bd. 30, S. 537-544.

Stassen JM, Lü G, Andréen O, Nyström E, Nyström A. 1995. Intraoperative thrombolytic treatment of microarterial occlusion by selective rt-PA infusion. *Plast Reconstr Surg.* Oct 1995, Bd. 96(5), S. 1215-7.

Sternbergh WC, Makhoul RG, Adelman B. 1993. Heparin prevents postischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg.* 1993, Bd. 17, S. 318-327.

Sumen C, Mempel TR, Mazo IB, von Andrian UH. 2004. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity.* Sep 2004, Bd. 21(3), S. 315-29.

Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. 2008. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol.* Feb 2008, Bd. 104(2), S. 338-46.

Taylor A, Granger D. 2003. Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003, Bd. 23, S. 675-80.

Tran NV, Bishop AT, Convery PA, Yu AY. 2006. Venous congestive flap salvage with subcutaneous rt-PA. *Microsurgery.* 2006, Bd. 26(5), S. 370-2.

Tsujikawa A, Kiryu J, Nonaka A, Yamashiro K, Nishiwaki H, Tojo SJ, Ogura Y, Honda Y. 1999. In vivo evaluation of platelet-endothelial interactions in retinal microcirculation of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov 1999, Bd. 40(12), S. 2918-24.

Umemura K, Higo K, Sakata T, Yuki S, Iwata K, Yamaguchi K. 2008. Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008, Bd. 36(5), S. 245-50.

Virchow, RLK. 1856. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin.* Frankfurt am Main : s.n., 1856. S. 219-732.

Virgini-Magalhães CE, Porto CL, Fernandes FF, Dorigo DM, Bottino DA, Bouskela E. 2006. Use of microcirculatory parameters to evaluate chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg.* May 2006, Bd. 43(5), S. 1037-44.

Waldner M, Hutter J, Uhl E, Baethmann A, Lehmberg J. 2007. Modified labeling technique for in vivo visualization of platelets in the cerebral microcirculation of Mongolian gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab.* Feb 2007, Bd. 27(2), S. 327-33.

Wang P, Ba ZF, Reich SS, Zhou M, Holme KR, Chaudry IH. 1996. Effects of nonanticoagulant heparin on cardiovascular and hepatocellular function after hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* Apr 1996, Bd. 270(4 Pt 2), S. H1294-302.

Willemart G, Knight KR, Morrison WA. 1998. Dexamethasone treatment prior to reperfusion improves the survival of skin flaps subjected to secondary venous ischaemia. *Br J Plast Surg.* Dec 1998, Bd. 51(8), S. 624-8.

Wong L, Im MJ, Hoopes JE. 1991. Increased survival of island skin flaps by systemic heparin in rats. *Ann Plast Surg.* Mar 1991, Bd. 26(3), S. 221-6.

Wright JG, Kerr JC, Valeri CR, Hobsen RW. 1988. Heparin decreases ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis model. *Arch Surg.* 1988, Bd. 123, S. 470-472.

www.cvpharmacology.com/thrombolytic/thrombolytic.htm. [Online]

Yang Y, Li Q, Yang T, Hussain M, Shuaib A. 2003. Reduced brain infarct volume and improved neurological outcome by inhibition of the NR2B subunit of NMDA receptors by

using CP101,606-27 alone and in combination with rt-PA in a thromboembolic stroke model in rats. *J Neurosurg.* Feb 2003, Bd. 98(2), S. 397-403.

Yong T, Zheng MQ, Linthicum DS. 1997. Nicotine induces leucocyte rolling and adhesion in the cerebral microcirculation of the mouse. *J Neuroimmunol.* Dec 1997, Bde. 80(1-2), S. 158-64.

Zhang F, Sones WD, Lineaweaver WC. 2001. Microsurgical flap models in the rat. *J Reconstr Microsurg.* Apr 2001, Bd. 17(3), S. 211-21.

9 Tabellen

9.1 Testtiere ohne Infusion (Kontrollgruppe A)

9.1.1 Kapillardichte

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	0	1,4	165,6	171,1
2	nekrotisch	0	0	156,9	222,3
3	nekrotisch	5,6	12,8	157,8	178,5
4	nekrotisch	0	13,1	165,8	214,1
5	nekrotisch	0	14,4	198,5	204,1

Tabelle 6: Kapillardichte (cm/cm²) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.1.2 Kapillardurchmesser

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	-	8,2	4,6	4,4
2	nekrotisch	-	-	4,8	5,0
3	nekrotisch	6,1	6,7	5,0	4,8
4	nekrotisch	-	8,4	5,1	5,4
5	nekrotisch	6,4	6,9	5,3	4,9

Tabelle 7: Kapillardurchmesser (µm) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.1.3 Adhärenzte Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	4	7	0	0
2	nekrotisch	0	0	0	0
3	nekrotisch	0	1	0	0
4	nekrotisch	3	1	1	0
5	nekrotisch	1	8	0	1

Tabelle 8: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.1.4 Fließende Thrombozyten

Tie r	Vitalität / Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	0	0	48	76
2	nekrotisch	0	0	30	6
3	nekrotisch	0	0	3	1
4	nekrotisch	0	0	16	8
5	nekrotisch	0	0	49	38

Tabelle 9: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.2 Testtiere mit Infusion von Tutofusin (Kontrollgruppe B)

9.2.1 Kapillardichte

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Peripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	20,3	0	165,8	155,8
2	vital	173,9	175,1	144,6	189,9
3	nekrotisch	0	0	208,2	210,8
4	nekrotisch	0	0	141,3	130,6
5	nekrotisch	160,6	153,9	158,7	176,0
6	nekrotisch	10,2	14,3	162,6	206,9
7	nekrotisch	80,5	34,5	174,0	161,2
8	nekrotisch	18,0	0	162,1	162,5

Tabelle 10: Kapillardichte (cm/cm²) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.2.2 Kapillardurchmesser

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	6,4	-	4,6	4,2
2	vital	5,6	5,1	4,5	4,8
3	nekrotisch	-	-	4,6	5,0
4	nekrotisch	-	-	4,6	4,5
5	nekrotisch	5,0	5,2	4,8	4,7
6	nekrotisch	6,2	5,7	4,2	4,9
7	nekrotisch	6,3	6,0	4,9	5,0
8	nekrotisch	5,9	-	4,9	5,0

Tabelle 11: Kapillardurchmesser (μm) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.2.3 Adhärente Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	3	10	0	0
2	vital	2	2	0	0
3	nekrotisch	9	2	1	0
4	nekrotisch	1	2	0	0
5	nekrotisch	13	1	0	0
6	nekrotisch	2	7	0	0
7	nekrotisch	3	0	0	1
8	nekrotisch	5	4	0	0

Tabelle 12: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.2.4 Fließende Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	3	0	3	2
2	vital	47	21	37	44
3	nekrotisch	0	0	24	6
4	nekrotisch	0	0	19	2
5	nekrotisch	8	6	11	8
6	nekrotisch	0	0	7	6
7	nekrotisch	0	0	21	4
8	nekrotisch	0	0	13	4

Tabelle 13: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.3 Testtiere mit Infusion von Heparin (Testgruppe C)

9.3.1 Kapillardichte

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	vital	161,4	117,4	159,7	172,9
2	vital	140,0	134,7	136,5	164,2
3	nekrotisch	166,0	139,1	178,6	184,4
4	nekrotisch	5,5	5,38	151,0	195,4
5	vital	133,1	102,4	169,5	169,2
6	vital	158,7	149,8	107,1	164,1
7	vital	120,2	168,7	163,8	197,0
8	vital	167,1	162,8	160,8	192,0
9	vital	170,0	176,6	167,1	165,9

Tabelle 14: Kapillardichte (cm/cm²) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.3.2 Kapillardurchmesser

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	vital	5,7	5,7	5,6	5,5
2	vital	5,5	5,0	4,7	4,5
3	nekrotisch	6,3	6,0	4,7	5,0
4	nekrotisch	5,6	6,6	4,7	4,5
5	vital	5,1	5,1	3,9	4,5
6	vital	5,7	5,7	3,9	4,1
7	vital	5,7	5,8	4,6	4,2
8	vital	5,6	5,7	5,0	4,8
9	vital	4,7	5,4	4,4	4,0

Tabelle 15: Kapillardurchmesser (μm) in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.3.3 Adhärenzte Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Pe- ripherie	Leiste Zentrum
1	vital	1	7	0	0
2	vital	2	3	0	0
3	nekrotisch	0	4	1	0
4	nekrotisch	19	17	0	0
5	vital	13	23	0	0
6	vital	0	0	0	0
7	vital	3	3	0	1
8	vital	0	1	0	0
9	vital	1	0	0	0

Tabelle 16: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.3.4 Fließende Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	vital	15	9	123	15
2	vital	2	1	25	6
3	nekrotisch	22	24	14	5
4	nekrotisch	0	0	30	28
5	vital	5	5	22	13
6	vital	6	2	13	6
7	vital	1	4	19	10
8	vital	1	1	19	4
9	vital	35	13	18	19

Tabelle 17: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.4 Testtiere mit Infusion von rtPA (Testgruppe D)

9.4.1 Kapillardichte

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	155,0	185,6	155,8	204,5
2	nekrotisch	0	0	186,5	148,1
3	nekrotisch	182,7	160,0	132,6	176,3
4	vital	65,8	160,6	172,3	208,0
5	vital	179,6	182,8	213,0	173,8
6	nekrotisch	60,0	-	162,2	122,5
7	vital	180,0	193,2	152,9	183,1
8	vital	164,7	177,3	196,7	161,3
9	vital	181,3	213,2	192,4	215,0
10	vital	180,9	194,6	166,2	172,1

Tabelle 18: Kapillardichte (cm/cm²) in den Gesichtsfeldern in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.4.2 Kapillardurchmesser

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	5,4	5,0	4,4	5,6
2	nekrotisch	-	-	4,8	4,9
3	nekrotisch	5,6	5,5	5,1	5,0
4	vital	5,6	5,4	4,3	4,6
5	vital	5,5	5,5	5,2	5,5
6	nekrotisch	4,9	-	4,6	4,8
7	vital	5,7	5,2	5,0	5,0
8	vital	4,6	4,9	4,1	3,9
9	vital	5,6	6,0	5,4	5,8
10	vital	5,6	5,5	4,8	5,0

Tabelle 19: Kapillardurchmesser (μm) in den Gesichtsfeldern in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.4.3 Adhärenzte Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	0	0	0	0
2	nekrotisch	1	1	0	0
3	nekrotisch	0	3	1	0
4	vital	4	2	0	0
5	vital	0	0	0	0
6	nekrotisch	0	4	0	0
7	vital	0	0	0	0
8	vital	1	0	0	0
9	vital	8	7	0	0
10	vital	5	6	0	0

Tabelle 20: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.4.4 Fließende Thrombozyten

Tier	Vitalität/ Nekrose	Lappen Pe- ripherie	Lappen Zentrum	Leiste Peripherie	Leiste Zentrum
1	nekrotisch	4	1	16	6
2	nekrotisch	0	0	4	1
3	nekrotisch	25	27	16	4
4	vital	3	1	15	5
5	vital	0	0	0	0
6	nekrotisch	6	5	9	7
7	vital	15	11	84	39
8	vital	14	14	20	16
9	vital	0	0	14	6
10	vital	11	12	8	13

Tabelle 21: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld

9.5 Bilder

9.5.1 Funktionelle Kapillardichte

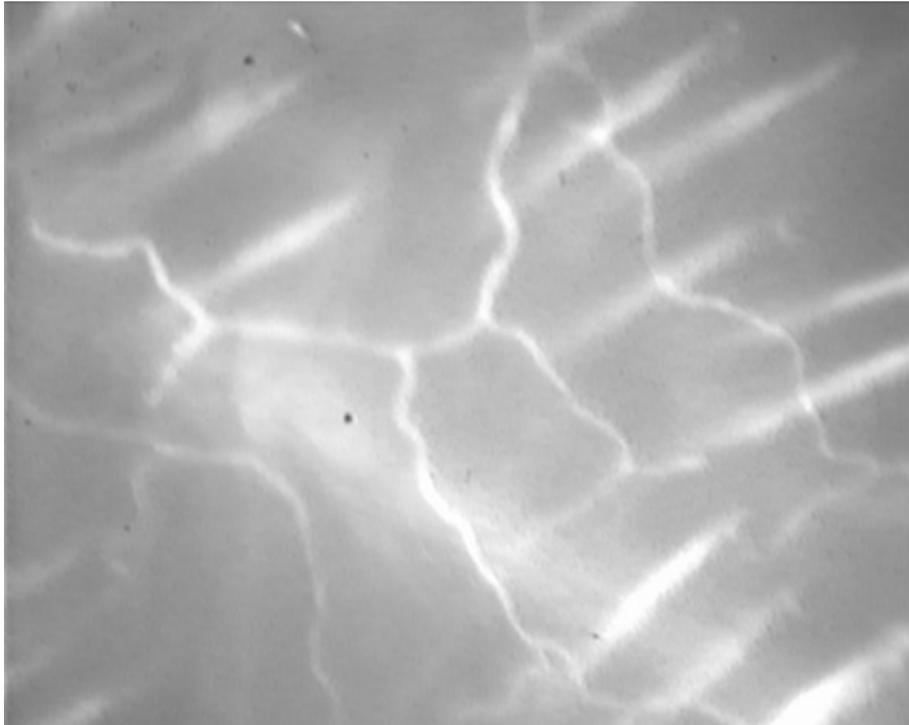


Abbildung 37: Durchblutete Kapillaren durch FITC-Dextran-markiertes Plasma sichtbar.

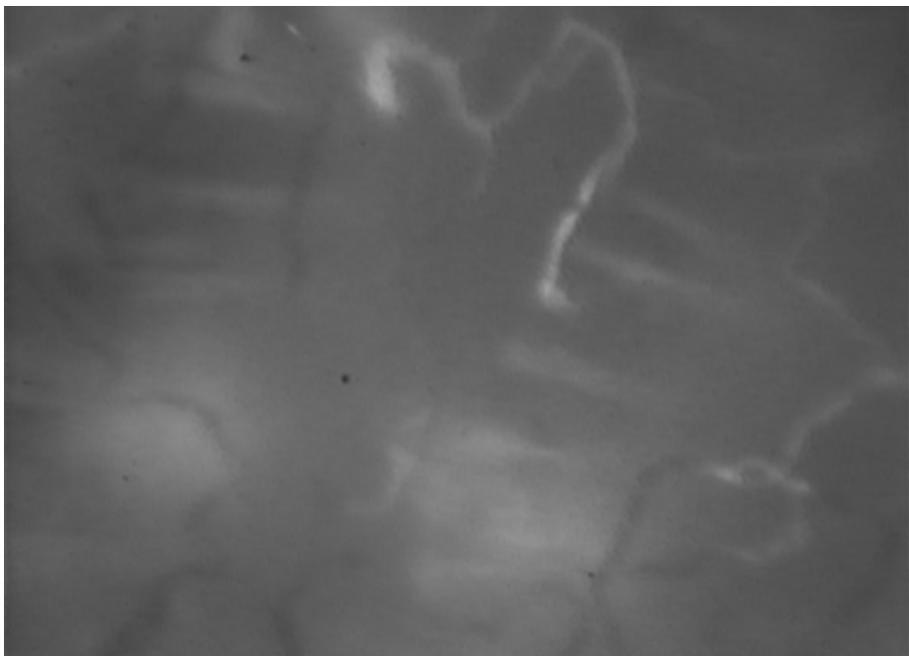


Abbildung 38: Durchblutete Kapillaren durch FITC-Dextran-markiertes Plasma sichtbar.
Einige Kapillaren sind nicht durch FITC-Dextran perfundiert und zeichnen sich dunkel ab.

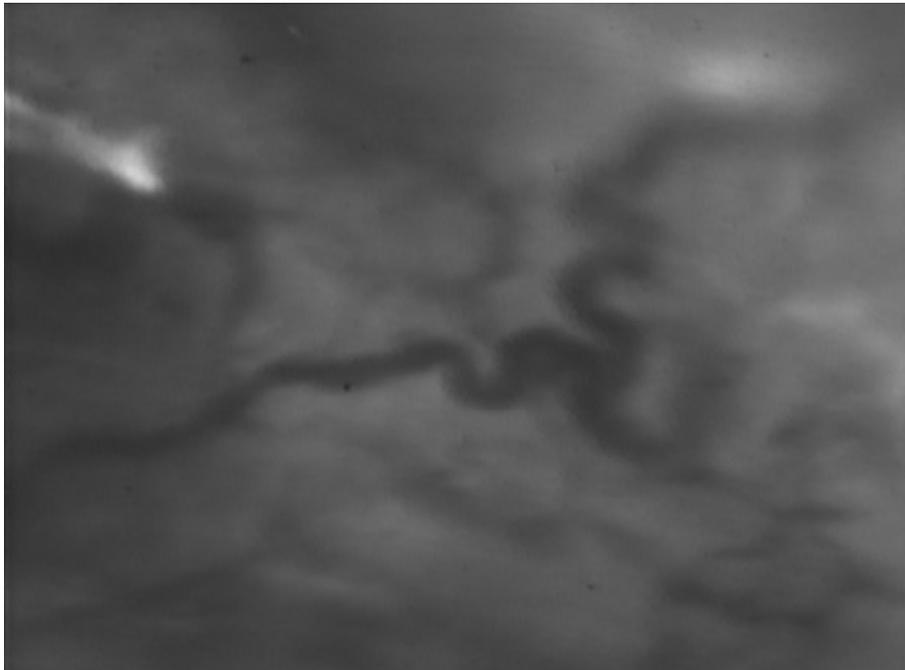


Abbildung 39: Gestautes Gefäß, das von der Injektion des FITC-Dextran nicht erreicht wurde.

9.5.2 Adhärenzte Thrombozyten

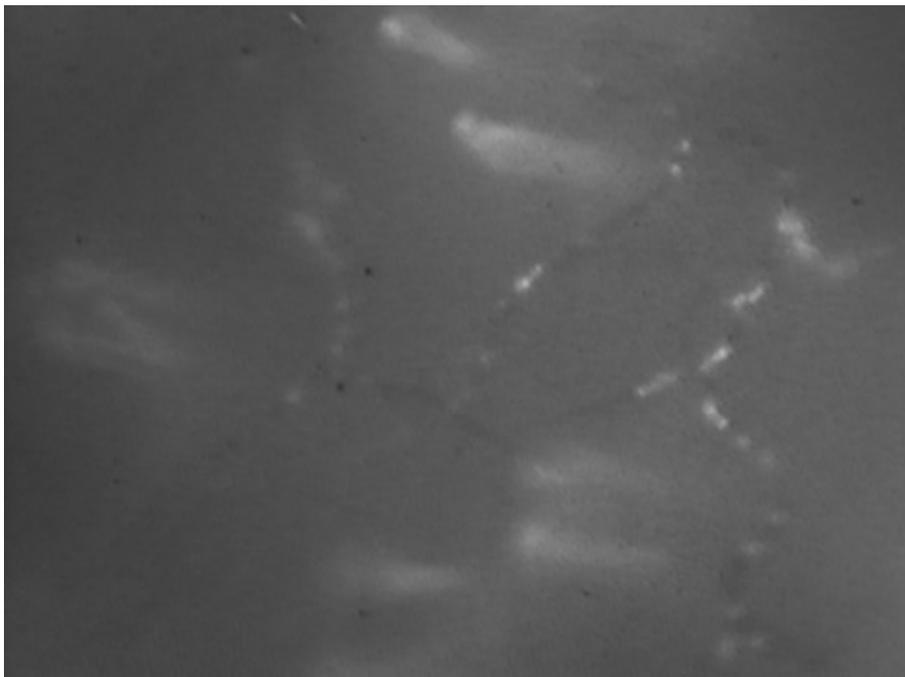


Abbildung 40: Adhärenzte markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappenzentrum

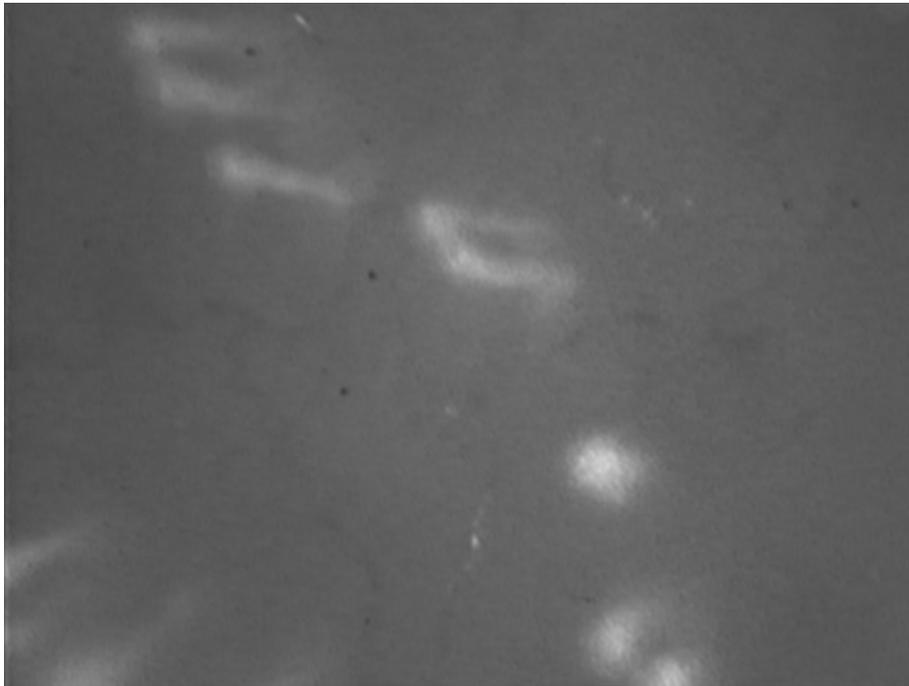


Abbildung 41: Adhärente markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappenzentrum

9.5.3 Fließende Thrombozyten

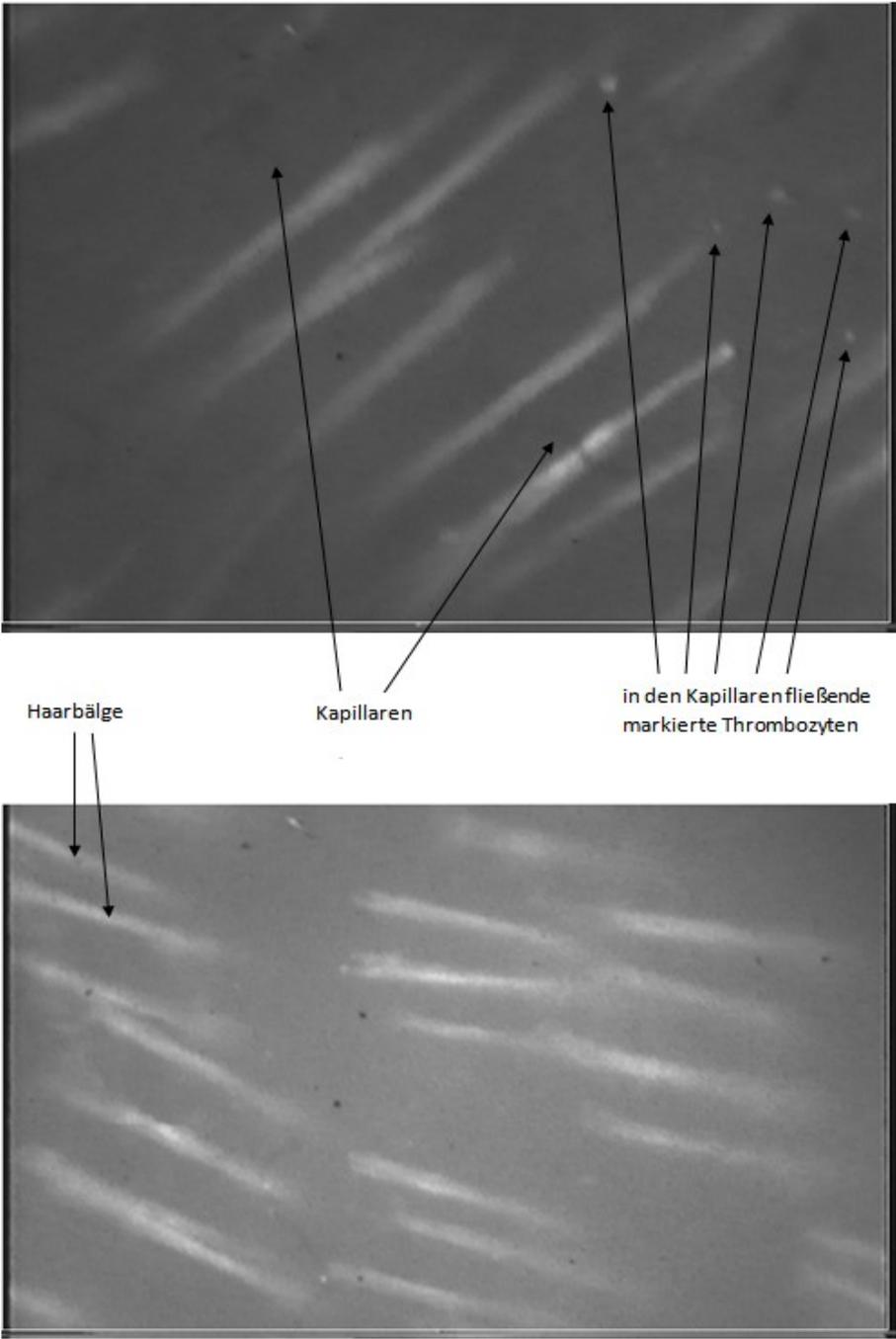


Abbildung 42: Fließende markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappen

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thromboseentstehung	12
Abbildung 2: Versuchsablauf.....	17
Abbildung 3: Lappenentnahmestelle in der Leiste beim Versuchstier	18
Abbildung 4: Lappenhebung in der Leiste beim Testtier	19
Abbildung 5: Versuchstier nach Abschluss der Transplantation.....	20
Abbildung 6: Katheter in Arterie eingeführt	25
Abbildung 7: Test auf positiven Rückfluss in den Katheter.....	25
Abbildung 8: Infusion in das Transplantat	25
Abbildung 9: Abklemmen der Transplantatvene	27
Abbildung 10: Abgeklemmte Lappenvene	27
Abbildung 11: Venöse Thrombose	27
Abbildung 12: Lappen post-OP.....	28
Abbildung 13: Nekrotischer Lappen 5. post-OP-Tag.....	28
Abbildung 14: Abfolge Dokumentation eines nekrotischen Lappens.....	31
Abbildung 15: Abfolge Dokumentation eines vitalen Lappens.....	31
Abbildung 16: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($x \pm \text{SEM}$) beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8), * $p \leq 0,05$ versus kontralaterale Leiste, (Wilcoxon-Test).....	34
Abbildung 17: Kapillardurchmesser (μm) ($x \pm \text{SEM}$) beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8)	35
Abbildung 18: Mittlere Anzahl ($x \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8).....	36

Abbildung 19: Mittlere Anzahl ($x \pm \text{SEM}$) in einer Minute fließender Thrombozyten beim Vergleich der Lappen mit der kontralateralen Leiste bei allen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) und allen Tieren der mit Vollelektrolytlösung infundierten Kontrollgruppe B (n=8).....	37
Abbildung 20: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test)	39
Abbildung 21: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen Gruppe C (Heparin) (n=7), * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe B (Mann-Whitney-Test)	40
Abbildung 22: Kapillardurchmesser (μm) ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7) * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test, T-Test (Lappen Peripherie))	41
Abbildung 23: Kapillardurchmesser (μm) ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7)	42
Abbildung 24: Mittlere Anzahl ($x \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7).....	43
Abbildung 25: Mittlere Anzahl ($x \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7)	44
Abbildung 26: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7) $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test).	45
Abbildung 27: Anzahl fließender Thrombozyten ($x \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe C (Heparin) (n=7).....	46

Abbildung 28: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6), $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test)	48
Abbildung 29: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6), $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe B, (Mann-Whitney-Test)	49
Abbildung 30: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den vitalen Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6) $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A, (Mann-Whitney-Test (Lappen-Peripherie), T-Test).....	50
Abbildung 31: Kapillardurchmesser (μm) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den vitalen Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)	51
Abbildung 32: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)	52
Abbildung 33: Mittlere Anzahl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mindestens 30 Sekunden adhärenter Thrombozyten beim Vergleich aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) mit den Lappen der Gruppe D (rtPA) (n=6)	53
Abbildung 34: Anzahl fließender Thrombozyten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe A (n=5) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (n=6), $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe A (Mann-Whitney-Test).....	54
Abbildung 35: Anzahl fließender Thrombozyten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) in den Lappen aller Tiere der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe B (n=8) verglichen mit den Lappen der Gruppe D (n=6), $*p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe B (Mann-Whitney-Test).....	55
Abbildung 36: Anteil nekrotischer Lappen in allen Gruppen	57
Abbildung 37: Durchblutete Kapillaren durch FITC-Dextran-markiertes Plasma sichtbar. ...	110
Abbildung 38: Durchblutete Kapillaren durch FITC-Dextran-markiertes Plasma sichtbar. Einige Kapillaren sind nicht durch FITC-Dextran perfundiert und zeichnen sich dunkel ab..	110

Abbildung 39: Gestautes Gefäß, das von der Injektion des FITC-Dextran nicht erreicht wurde.	111
Abbildung 40: Adhärente markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappenzentrum ..	111
Abbildung 41: Adhärente markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappenzentrum ..	112
Abbildung 42: Fließende markierte Thrombozyten in den Kapillaren im Lappen	113

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen.....	24
Tabelle 2: Vitalität der Transplantate der beiden Kontrollgruppen * $p \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppen (Fisher-Exakt-Test)	38
Tabelle 3: Vitalität der Transplantate der Kontrollgruppen versus Heparin	47
Tabelle 4: Vitalität der Transplantate der unbehandelten Kontrollgruppe A versus rtPA	56
Tabelle 5: Vitalität der Transplantate der mit Vollelektrolytlösung behandelten Kontrollgruppe A versus rtPA.....	56
Tabelle 6: Kapillardichte (cm/cm^2) in der IVM in einem Gesichtsfeld	97
Tabelle 7: Kapillardurchmesser (μm) in der IVM in einem Gesichtsfeld	97
Tabelle 8: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld	98
Tabelle 9: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld	98
Tabelle 10: Kapillardichte (cm/cm^2) in der IVM in einem Gesichtsfeld	99
Tabelle 11: Kapillardurchmesser (μm) in der IVM in einem Gesichtsfeld	100
Tabelle 12: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld	100
Tabelle 13: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld	101
Tabelle 14: Kapillardichte (cm/cm^2) in der IVM in einem Gesichtsfeld	102
Tabelle 15: Kapillardurchmesser (μm) in der IVM in einem Gesichtsfeld	103
Tabelle 16: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld	104
Tabelle 17: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld	105

Tabelle 18: Kapillardichte (cm/cm^2) in den Gesichtsfeldern in der IVM in einem Gesichtsfeld	106
Tabelle 19: Kapillardurchmesser (μm) in den Gesichtsfeldern in der IVM in einem Gesichtsfeld	107
Tabelle 20: Anzahl der länger als 30 Sekunden am Endothel anhaftenden angefärbten Thrombozyten in der IVM in einem Gesichtsfeld	108
Tabelle 21: Anzahl der durchgeflossenen angefärbten Thrombozyten in 60 Sekunden in der IVM in einem Gesichtsfeld	109

12 Danksagung

Ich möchte allen danken, die ein Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zunächst ein Dank an Herrn Prof. Dr. Martin Baumeister für die zur Verfügungsstellung dieser Studie und die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Frick. Bei der Ausarbeitung des schriftlichen Teils und der statistischen Auswertung stand er mir mit einer unermüdlichen Geduld zur Seite. Jederzeit stand er für Fragen, Korrekturvorschlägen und Hilfestellungen zur Verfügung und trug mit seinen kritischen und konstruktiven Anregungen schließlich maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Ebenso danken möchte ich Herrn Dr. Jens Wallmichrath für die hervorragende Betreuung und Mitarbeit während der experimentellen Phase im Labor. Seine mikrochirurgischen Operationen waren die Basis meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Eichhorn und den Mitarbeitern im Labor im Institut für chirurgische Forschung bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann, der mir bei Fragen zur technischen Aufbereitung der Arbeit sehr hilfreich zur Seite stand.