

LUKAS JÄGER

Einfluss Endothelialer Progenitorzellen
auf die Revaskularisation mikrovaskulärer
anastomosierter Fernlappentransplantate

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFBENGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere – Chirurgie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. (Bursa) Dr. h.c. (Torun) Martin Kramer
und
aus dem Institut für Anatomie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Maximilian Ackermann

Einfluss Endothelialer Progenitorzellen auf die Revaskularisation mikrovaskulärer anastomosierter Fernlappentransplantate

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Lukas Jäger

Tierarzt aus Offenbach am Main

Gießen 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter

Prof. Dr. Dr. h.c. (Bursa) Dr. h.c. (Torun) Martin Kramer

Priv.-Doz. Dr. Maximilian Ackermann

Tag der Disputation 26.05.2023

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abkürzungsverzeichnis	IV
3	Einleitung	1
4	Literaturübersicht	3
4.1	Anatomie und Histologie	3
4.1.1	Allgemeine Körperdecke	3
4.1.2	Aufbau der Blutgefäße	4
4.2	Wundheilung und ihre Grenzen	5
4.2.1	Arten der Wundheilung	5
4.2.2	Phasen der Wundheilung	5
4.2.3	Grenzen der Wundheilung	7
4.3	Plastische Chirurgie	7
4.3.1	Ästhetische, Verbrennungs-, Hand- und Pfotenchirurgie	8
4.3.2	Rekonstruktive Chirurgie	8
4.4	Lappentransplantate	9
4.4.1	Definitionen	9
4.4.2	Einteilung	10
4.4.3	Einsatzgebiete in der Tiermedizin	12
4.4.4	Komplikationen	14
4.5	Mikrochirurgie	17
4.5.1	Definition und Entwicklung	17
4.5.2	Optische Vergrößerungshilfen	17
4.5.3	Instrumentarium und Nahtmaterial	17
4.5.4	Mikrovaskuläre Anastomosen	18
4.6	Neovaskularisation	19
4.6.1	Angiogenese	19
4.6.2	Vaskulogenese	22
4.7	Endotheliale Progenitorzellen	22
4.7.1	Definition und Geschichte	22
4.7.2	Gewinnung und Einteilung	23
4.7.3	Funktion und Einsatz	24
5	Material und Methoden	26
5.1	Material	26

5.2	Versuchstiere.....	32
5.3	Versuchsaufbau	32
5.3.1	Etablierung der Methoden	32
5.3.2	Vorversuch.....	33
5.3.3	Hauptversuch	33
5.3.4	Aufbereitung der Endothelialen Progenitorzellen	34
5.3.5	Operation	34
5.3.6	Histologie.....	39
5.3.7	Perfusion.....	43
5.3.8	Vermessung der dreidimensionalen Gefäßarchitektur	43
5.4	Statistische Auswertung	46
5.4.1	Vorversuch.....	46
5.4.2	Hauptversuch	46
6	Ergebnisse.....	47
6.1	Etablierung Operation und Perfusion.....	47
6.2	Vorversuch.....	48
6.2.1	Tierzahl	48
6.2.2	Histologie.....	49
6.2.3	Perfusion.....	52
6.3	Hauptversuch	60
6.3.1	Tierzahl	60
6.3.2	Histologie.....	60
6.3.3	Perfusion.....	66
7	Diskussion.....	72
7.1	Ergebnisbezogener Abschnitt.....	72
7.1.1	Etablierung der Methoden	72
7.1.2	Vorversuch.....	73
7.1.3	Hauptversuch	76
7.2	Limitationen und methodische Beschränkungen.....	79
7.3	Ausblick.....	82
8	Zusammenfassung.....	84
9	Summary.....	85
10	Literatur.....	86
11	Anhang.....	100
11.1	HE-Färbung	100
11.2	CD 31-Immunhistochemie.....	100

11.3	PCNA.....	100
12	Eigene Publikationen.....	102
13	Danksagung.....	103
14	Erklärung.....	104

2 Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Ac-LDL	<i>acetylated-low density lipoprotein</i>
AG	Aktiengesellschaft
APF	<i>Axial pattern flap(s)</i> /gestieltes Lappentransplantat mit axialer Blutversorgung
BRA	<i>branching angle</i> /Winkel der Gefäßaufzweigungen
CAC	<i>Circulating angiogenic cell(s)</i> /zirkulierende Zellen mit angiogenem Potential
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD34	<i>Cluster of Differentiation 34</i>
CD133	<i>Cluster of Differentiation 133</i>
CFU-EC	<i>Colony-forming unit endothelial cell(s)</i> /Koloniebildende Einheit von Endothelzellen
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
Dil	<i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate</i>
Dll4	<i>Delta-like 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECFC	<i>Endothelial colony forming cell(s)</i> /Endotheliale, kolonieformende Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	<i>Endothelial Progenitor cell(s)</i> /Endotheliale Vorläuferzelle(n)
et al.	<i>et alii</i> /und weitere
EZ	Endothelzelle(n)
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.a.	intraarteriell
i.p.	intraperitoneal
IA	<i>Intussusceptive Angiogenesis</i> /Spaltende Angiogenese
IBD	<i>interbranching distance</i> /Abstand der Gefäßaufzweigungen
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IVD	<i>intervascular distance</i> /Abstand zwischen Gefäßen

kg	Kilogramm
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KM	Knochenmark
Ltd.	<i>Limited Company</i> /Kapitalgesellschaft
M.	<i>Musculus</i> /Muskel
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> /Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MNC	<i>mononuclear cells</i> /Mononukleäre Zellen
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> /Mesenchymale Stammzellen
NaCl	isotone Kochsalzlösung
Nr.	Nummer
OP	Operation, operations-
PAC	<i>proangiogenic cells</i> /proangiogene Zellen
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> /Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i> /plättchenreiches Plasma
REM	Rasterelektronenmikroskop
s.c.	subkutan
SA	<i>Sprouting Angiogenesis</i> /Sprossende Angiogenese
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
u.a.	und andere
UEA-1	<i>Ulex europaeus agglutinin-1</i> lectin
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V.	Vena
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
Vv.	Venae
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel

3 Einleitung

Der Verschluss großflächiger Wunden im Bereich der Gliedmaßen und des Kopfes ist in der Veterinär- und Humanmedizin eine große Herausforderung. So ist nach radikalen Tumorentfernungen oder traumatischen Wunden häufig nicht genug gesundes Gewebe vorhanden, um den Wundbereich vollständig, spannungsfrei und – dieser Punkt ist beim Tier weniger relevant - ästhetisch abzudecken. Beim Menschen machen Neoplasien des Kopf- und Halsbereichs vier Prozent der jährlich neu diagnostizierten Krebserkrankungen aus (3).

In der Veterinärmedizin entfallen im Kleintierbereich circa 40 % der diagnostizierten Tumorerkrankungen auf die Haut und die Maulhöhle (4, 5) und bereiten an diesen Lokalisationen ebenfalls Probleme bei der Defektdeckung. Gleiches gilt für Wunden der distalen Gliedmaßen, die bis zu 26 % der Sportverletzungen bei Hunden ausmachen (6).

Um diesem Problem zu begegnen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Methoden etabliert, von denen sich das Verpflanzen von sogenannten Lappentransplantaten durchgesetzt hat: Hierbei wird patienteneigenes Haut-, Muskel- und Knochengewebe zur Versorgung der Wunde verwendet. Es können lokale Lappen aus der unmittelbaren Nähe des Defekts oder Fernlappen aus einer anderen Körperregion unterschieden werden (7). Zum Einsatz kommen Methoden der Mikrochirurgie, die in der Humanmedizin seit den ersten Versuchen vor über 50 Jahren eine starke Verbreitung und vielfältige Anwendungsgebiete gefunden hat. Vor allem die Möglichkeit, die (Re-)Adaption von kleinsten Blutgefäßen (mikrovaskuläre Anastomosen) durchzuführen, erschloss eine Vielzahl an neuen Behandlungsmöglichkeiten. Auch in der Tiermedizin mehren sich die Anwendungsgebiete, z.B. in der Ophthalmologie oder bei Nierentransplantationen (8).

Misserfolge bei dieser Art von Wundversorgung sind gravierend und erfordern in der Regel eine erneute Operation. Um eine erfolgreiche Durchführung zu erreichen, ist eine ausreichende Blutversorgung des Transplantats entscheidend (9, 10). Zur Verbesserung der Erfolgsraten werden deshalb unterstützende Maßnahmen wie die Applikation von Wachstumsfaktoren oder Stammzellen experimentell und klinisch untersucht. So wurden endotheliale Vorläuferzellen (*Endothelial Progenitor cells*, EPC) seit ihrer Beschreibung 1997 (11) in mehreren Studien erfolgreich eingesetzt (12, 13). Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von EPC die Entstehung neuer Gefäße (Neovaskularisation) bei Ischämie oder Infarkt fördert (14, 15). In klinischen Versuchen zeigte sich ein positiver Effekt der EPC-Applikation bei menschlichen Patienten mit Ischämie der unteren Extremitäten (16). Ebenfalls konnte ein positiver Einfluss des Einsatzes von EPC auf die Überlebensraten von gestielten und lokalen Lappen im Tiermodell (13, 17) gezeigt werden.

Der Einsatz bei Fernlappen-Transplantaten ist noch nicht untersucht worden. Bei diesen finden sich Einflussfaktoren, die bei lokalen Lappen keine oder nur eine geringe Rolle spielen: Das Transplantat ist einer intraoperativen Ischämie-Zeit ausgesetzt und die mikrovaskuläre Anastomose muss durchgängig bleiben.

Aus diesem Grund lassen sich die Ergebnisse nicht ohne Weiteres übertragen. In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese geprüft werden, dass sich durch die Applikation von EPC eine gesteigerte Neovaskularisation und damit eine verbesserte Wundheilung in Fernlappen-Transplantaten erzielen lässt.

4 Literaturübersicht

4.1 Anatomie und Histologie

4.1.1 Allgemeine Körperdecke

Die allgemeine Körperdecke (*Integumentum commune*) ist das größte (Sinnes-)Organ des menschlichen und tierischen Körpers, schützt diesen und grenzt ihn gegen die Umwelt ab (18). Sie besteht aus drei Schichten: Oberhaut (*Epidermis*) und Lederhaut (*Dermis*) bilden die eigentliche Haut (*Kutis*), unter der die Unterhaut (*Subkutis*) liegt (19) (siehe Abbildung 4-1).

Die *Epidermis* bildet als äußerste Schicht die Grenze des Organismus zur Umwelt und besteht histologisch aus einem mehrschichtigen Plattenepithel (18–20). Die *Dermis* besteht aus dem *Stratum reticulare* und *papillare* und bildet die Unterlage der Haut und bestimmt ihre Dicke und Zugfestigkeit durch einen hohen Anteil an kollagenen Fasern (18–20). Beide Schichten enthalten Kollagenfasern, deren Anzahl und Größe die Elastizität der Haut bestimmt. Die Haut der Hals- und Flankenregion enthält wenige, lockere Kollagenfasern, wodurch sie sehr verschieblich ist. Die Haut an Schwanz und Ohr enthält mehr und rigidere Fasern und ist dadurch kaum verschieblich (21).

Die *Subkutis* setzt sich aus lockerem Binde- und eingelagertem Fettgewebe zusammen, das als Kälteschutz und Energiespeicher fungiert. Sie bildet eine verschiebbare Schicht zwischen *Dermis* und der oberflächlichen Faszie (*Fascia superficialis*) und enthält den je nach Tierart unterschiedlich stark entwickelten *Musculus (M). panniculus carnosus* (18–21).

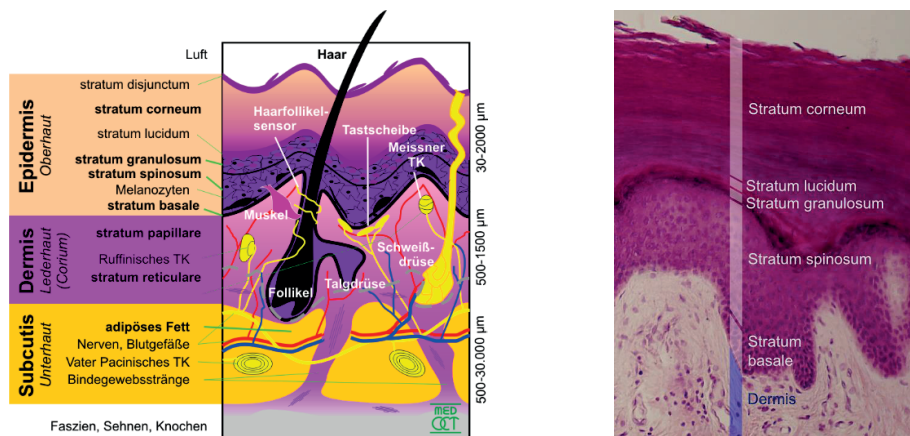


Abbildung 4-1: Links schematischer (Wikipedia, 2019) (22) und rechts mikroskopischer Aufbau der Säugetierhaut (HE-Färbung, 100fache Vergrößerung) (Blausen, 2014) (1)

Subkutis und *Dermis* werden direkt durch Blutgefäße versorgt, die *Epidermis* durch Diffusion (20). Arterien aus der *Subkutis* ziehen in die *Dermis* verzweigen sich dort zu einem ersten Gefäßnetz zwischen *Dermis* und *Subkutis* (*Rete arteriosum dermidis*) sowie zu einem zweiten zwischen *Stratum papillare* und *reticulare* innerhalb der Lederhaut (*Rete arteriosum subpapillare*). Über weitreichende Venenplexus, die auch als Blutspeicher und damit der Wärmeregulation dienen, fließt das Blut wieder ab (18–20). Bei Menschen werden zwei Arten von Arterien unterschieden, die die Haut versorgen. Muskulokutane Arterien verlaufen senkrecht zur darüber liegenden Haut, direkte kutane Arterien verlaufen parallel und beide entspringen aus sogenannten Perforator-Gefäßen, die die subkutane Muskulatur durchlaufen (20, 21). Bei Hund und Katze kommen nur direkte kutane Arterien vor (21).

4.1.2 Aufbau der Blutgefäße

Die Blutgefäße bilden im Körper der Säugetiere ein verzweigtes, geschlossenes System zum Transport des Blutes. Man unterscheidet Arterien und Arteriolen, die vom Herzen wegführen und Venen und Venolen, die zum Herzen hinführen. Der Übergang findet in den Kapillargefäßen statt, in denen der Stoffaustausch passiert. Die größeren Blutgefäße haben vom Lumen ausgehend einen dreischichtigen Aufbau aus *Tunica interna* (Intima), *Tunica media* (Media) und *Tunica adventitia* (Adventitia) (18) (siehe Abbildung 4-2).

Die *Tunica interna* setzt sich aus einer Lage Endothelzellen mit Basalmembran, dem *Stratum subendotheliale* aus Bindegewebe und der *Membrana elastica interna* zusammen. Sie ermöglicht den Stoffaustausch und den Übertritt von Zellen in benachbartes Gewebe. Die *Tunica media* besteht aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern. Sie ermöglicht Kontraktionen der Gefäßwand. Bei größeren Gefäßen liegt zwischen *Tunica media* und *adventitia* die *Membrana elastica externa*. Die *Tunica adventitia* bettet die Gefäße über lockeres Bindegewebe in der Umgebung ein. Sie enthält vegetative Nerven zur Steuerung der Kontraktionen und bei großen Gefäßen kleinste Blutgefäße (*Vasa vasorum*) zur Ernährung des Hauptgefäßes (19). Venen besitzen zusätzlich Klappen, die als Ausstülpung der *Tunica interna* einen Rückstrom des Blutes vom Herzen weg verhindern (20).

Die kleinsten Kapillargefäße bestehen nur aus einem einschichtigen Endothel, einer darunter liegenden Basalmembran und den weiter außen liegenden Perizyten. Je nach Anforderungen entwickeln sich drei verschiedene Typen von Kapillaren, die sich in der Durchlässigkeit ihres Endothels unterscheiden (18–20).

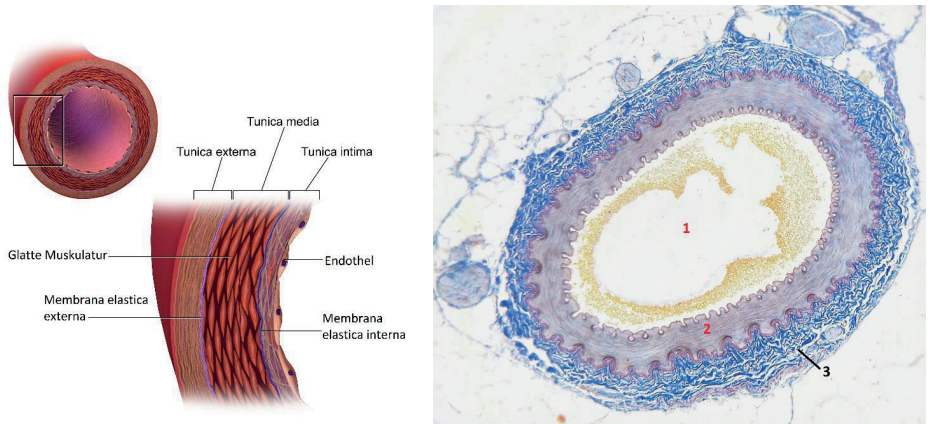


Abbildung 4-2: Links schematischer (modifiziert nach Blausen, 2014 (1)) und rechts mikroskopischer (modifiziert nach Wikipedia, 2021 (2)) Aufbau der Gefäßwand einer Arterie (Masson-Trichrom-Färbung, 100fache Vergrößerung). 1 Lumen, 2 Tunica media, 3 Tunica externa

4.2 Wundheilung und ihre Grenzen

4.2.1 Arten der Wundheilung

Es werden zwei Arten der Wundheilung unterschieden. Bei der primären Wundheilung (*Sanatio per primam intentionem*) kommt es zu einem schnellen Wundverschluss ohne Bildung von Granulationsgewebe. Dies ist nur bei Wunden möglich, die glatte und nah beieinanderliegende Wundränder aufweisen, die sich adaptieren lassen.

Eine sekundäre Wundheilung (*Sanatio per secundam intentionem*) erfolgt verzögert über die Bildung von Granulationsgewebe als Zwischenstufe, wenn die Wundränder weiter voneinander entfernt liegen und sich nicht adaptieren lassen. Die Epithelialisierung des Wundgebiets geht von den Wundrändern aus (23, 24).

Im Rahmen der chirurgischen Wundbehandlung kann ein Wundverschluss primär oder sekundär erfolgen. Eine saubere Wunde wird direkt adaptiert und verschlossen (primär). Eine verschmutzte oder infizierte Wunde wird zunächst offen behandelt oder temporär abgedeckt. Nach der Bildung von Granulationsgewebe kann sie direkt verschlossen oder mit Ersatzgewebe abgedeckt werden (sekundär) (25, 26).

4.2.2 Phasen der Wundheilung

Der Vorgang der Wundheilung wird – je nach Autor - in drei (20, 24) bzw. vier Phasen (25) gegliedert: Blutstillung (Koagulation/Hämostase), Entzündung (Inflammation), Reparatur (Proliferation) und Reifung (Maturation). Häufig wird die Koagulation als eigenständiger Prozess vorangestellt und es werden nur die folgenden drei Phasen beschrieben. Andere Autoren unterscheiden nur eine frühe und

eine späte, zelluläre Phase, um die Dynamik der Wundheilung und die Überlappung der einzelnen Phasen besser darzustellen (27). Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Wundheilung zeigt Abbildung 4-3.

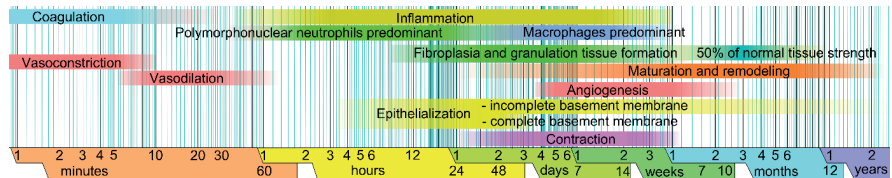


Abbildung 4-3: Zeitlicher Ablauf der Wundheilung (Wikipedia, 2019)(28)

Nach einem Insult füllt sich der Wundbereich mit Blut und Lymphe. Um einem weiteren Blutverlust entgegenzuwirken, beginnt mit der Vasokonstriktion der verletzten Gefäße die Blutstillung. Durch die Verletzung des Endothels kommt Blut in Kontakt mit subendothelialen Strukturen und die Mechanismen der primären und sekundären Hämostase beginnen (29–31).

Im Rahmen der primären Hämostase lagern sich die Blutplättchen (Thrombozyten) an Bindegewebsfasern an und werden über Fibrinogen zunächst reversibel verknüpft.

Der noch ungenügende Gefäßverschluss wird über die parallel ablaufenden Mechanismen der sekundären Hämostase verstärkt. Dies geschieht durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade über das extrinsische und intrinsische System (29–31). Beide münden in der Aktivierung von Thrombin, welches Fibrinogen in seine aktive Fibrin-Form aufspaltet, die die Thrombozyten als lösliche Fibrinmonomere miteinander verbindet (29, 31). Der entstandene Thrombus dient als erster Wundverschluss und Gerüst für die nachfolgenden Vorgänge.

Im Rahmen der Entzündungsreaktion wird abgestorbenes Gewebe und infektiöses Material entfernt, damit der eigentliche Heilungsprozess beginnen kann. Die im Wundbereich vorhandenen Thrombozyten schütten eine große Anzahl an proinflammatorischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren aus. *Platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF-β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und andere fördern die Zellproliferation und Zellmigration in das Wundgebiet. Histamin, Prostaglandine und Bradykinin bewirken eine Vasodilatation und erhöhte Permeabilität der Endothelbarriere, wodurch Leukozyten und Proteine in das Wundgebiet gelangen. Nach wenigen Stunden beginnen die neutrophilen Granulozyten als vorherrschende Zellpopulation mit der Phagozytose von abgestorbenem Gewebe und Bakterien. Ab dem vierten Tag dominieren Makrophagen, die die Phagozytose fortsetzen, Mediatoren freigeben, welche die Gefäßneubildung (Angiogenese) stimulieren, Granulationsgewebe bilden und die Epithelbildung stimulieren (29–31).

Gegen Ende der Entzündungsphase sezernieren Makrophagen antiinflammatorische Zytokine und leiten so den Übergang zur Proliferationsphase ein. In dieser bildet sich Granulationsgewebe aus Fibroblasten, Granulozyten und Makrophagen.

Unter dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bilden Fibroblasten eine neue extrazelluläre Matrix, welche als Gerüst für die anderen Zellen fungiert. Von den Wundrändern aus beginnt die Neubildung von Epithel durch die Keratinozyten, während die Angiogenese durch Endothelzellen initiiert wird. Gegen Ende der Proliferation verändern sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten, die die Kollagenmasse erhöhen und die Wundkontraktion einleiten (29, 30).

Mit Abschluss der Reepithelialisierung der Wunde beginnt der Prozess der Maturation. Über Monate bis Jahre richten sich die Kollagenfasern an den Zuglinien der Wunde aus und geben ihr neue Zugfestigkeit. Das Granulationsgewebe wird weiter ab- und zu Narbengewebe umgebaut (29).

4.2.3 Grenzen der Wundheilung

Hohes Alter, endokrine Erkrankungen, Fremdmaterial im Wundbereich und andere Faktoren können zu Wundheilungsstörungen und chronischen Wunden führen (25, 30, 32) und eine erneute chirurgische Intervention nötig machen.

Ebenso ist bei großen oder tiefgehenden Defekten weder eine sekundäre Wundheilung noch ein direkter primärer Wundverschluss möglich. In diesen Fällen können die Methoden der rekonstruktiven und plastischen Chirurgie zum Einsatz kommen, insbesondere Lappentransplantate (26).

4.3 Plastische Chirurgie

In der Humanmedizin stellt die plastische Chirurgie ein eigenständiges Fachgebiet dar (33), die sich mit der „Herstellung und Wiederherstellung der Form und Funktion des gesamten menschlichen Körpers“ beschäftigt und die Teilbereiche Rekonstruktive Chirurgie, Handchirurgie, Verbrennungschirurgie und ästhetische Chirurgie umfasst (26). Eine vergleichbare Spezialisierung existiert in der Veterinärmedizin nicht (34), obwohl plastisch-ästhetische Eingriffe wie das Kupieren von Ohren oder Schwanz schon lange durchgeführt werden (35).

Doch auch in der Tiermedizin wächst die Bedeutung der plastischen Chirurgie. Da in unserer Gesellschaft die Haustiere einen immer höheren Stellenwert einnehmen, wird ihnen eine bessere medizinische Versorgung zu teil (36). Dies führt vor allem im Bereich der kleinen Haussäugetiere (besonders Hund und Katze) zu einer fortschreitenden Spezialisierung der Veterinärmedizin (37) und zu häufigeren Einsatzmöglichkeiten der plastischen Chirurgie.

4.3.1 Ästhetische, Verbrennungs-, Hand- und Pfotenchirurgie

Ästhetische Eingriffe – mit teilweise fragwürdiger Indikation - werden vorwiegend im anglo-amerikanischen Raum durchgeführt, beispielsweise das Entfernen der Krallen bei Katzen zur Vermeidung von Kratzverletzungen, das teilweise Entfernen der Stimmbänder bei Hunden (Ventriculocordectomy) bei übermäßigem Bellen oder das Fettabsaugen (Liposuktion) (38, 39).

In Deutschland sind die meisten Eingriffe dieser Art durch das Tierschutzgesetz verboten (40), eine Ausnahme stellt das Kupieren des Schwanzes bei jagdlich geführten Hunden dar.

Verbrennungen treten in der Veterinärmedizin seltener als in der Humanmedizin auf (41). Je nach Ausmaß der Läsion reichen konservative Maßnahmen zur Heilung aus oder es kommen Methoden der plastischen Chirurgie zur Defektdeckung in Frage (42).

Ähnlichkeiten zur humanen Handchirurgie weist die Behandlung von Verletzungen der Pfoten auf. Im Vordergrund steht jedoch nicht der Erhalt der motorischen Fähigkeiten, sondern der Erhalt ihrer mechanischen Funktion. Die Ballen der Kleintiere sind extremen Kräften ausgesetzt und dementsprechend hoch spezialisiert (18). Ihre mechanische Belastbarkeit lässt sich durch einfache Defektdeckung oder Verpflanzung von Haut nicht erreichen. Darum werden auch hier plastische Techniken wie das Transplantieren von Ballen notwendig. Bei ausbleibendem Erfolg kann die Amputation der Gliedmaße erforderlich werden (42).

4.3.2 Rekonstruktive Chirurgie

Die Rekonstruktive Chirurgie umfasst zunächst die Behandlung angeborener oder erworbener Fehlbildungen, beispielsweise im kraniofazialen (Kiefer-, Gaumenspalten, Brachycephalie), kardiovaskulären (Pulmonalstenose, portosystemischer Shunt) oder urogenitalen (Phimose, Hypospadie) Bereich (43).

Der zweite Aufgabenbereich ist die Wundversorgung, die in Human- und Veterinärmedizin eine lange Tradition hat. Hierzu zählt einerseits die Behandlung traumatischer Wunden, beispielsweise nach Bissverletzungen oder Autounfällen, und andererseits die Defektdeckung nach chirurgischer Gewebsentfernung, beispielsweise bei Neoplasien (43, 44). Da die Haut der Kleintiere verschieblicher und lockerer als die des Menschen ist, kann in der Tiermedizin auch bei großflächigen Wunden häufiger ein primärer Wundverschluss erfolgen (45). Ist dies nicht möglich, können lokale Techniken wie Entlastungsschnitte oder Plastiken (Z-Plastik u.a.) zum Einsatz kommen. Infizierte oder großflächige Wunden können auch sekundär abheilen, besonders am Rumpf (43). Nachteile bestehen dabei jedoch in der langen Heilungsdauer und der Fragilität der entstehenden Narbe. Ist weder ein primärer Wundverschluss noch eine sekundäre Wundheilung möglich, werden komplexere Methoden der Defektdeckung erforderlich; entsprechend dem Prinzip der „rekonstruktiven Leiter“ in der Humanmedizin (7).

Die zunehmende Bedeutung der rekonstruktiven Chirurgie in der Veterinärmedizin begründet sich in der fortschreitenden Entwicklung der Onkologie, die vor allem im Kleintierbereich stattfindet. Hier setzte sich die Erkenntnis durch, dass Neoplasien einer aggressiven chirurgischen Entfernung mit tumorzell-freien Wundrändern bedürfen, um Rezidive zu verhindern und gegebenenfalls kurativ zu sein (46). Die daraus entstehenden, mitunter tiefgehenden Defekte sind in der Regel nicht direkt primär zu verschließen und können mit rekonstruktiven Methoden versorgt werden.

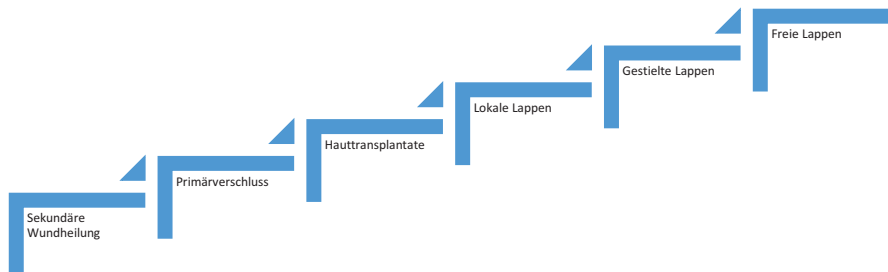


Abbildung 4-4: Darstellung der rekonstruktiven Leiter, modifiziert nach Dragu, 2008 (7)

4.4 Lappentransplantate

4.4.1 Definitionen

Im medizinischen Sinn versteht man unter Transplantation die „Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen auf ein anderes Individuum oder an eine andere Körperstelle zu therapeutischen Zwecken“ (23). Nach immunologischen Kriterien unterscheidet man vier Transplantationsarten, die in Tabelle 4.1 dargestellt sind (26).

Bezeichnung	Definition	Beispiel
Autogene Transplantation	Spender = Empfänger	Bypass-Operation
Isogene Transplantation	Spender und Empfänger genetisch identisch	Organspende bei eineiigen Zwillingen
Allogene Transplantation	Spender und Empfänger gleiche Spezies	Organspende (Nieren-, Herztransplantation)
Xenogene Transplantation	Spender und Empfänger unterschiedliche Spezies	Herzklappenersatz durch Schweineklappen

Tabelle 4-1: Einteilung von Transplantaten anhand immunologischer Gesichtspunkte (nach Siewert, 2012) (26)

Das Abdecken von Wunden durch Lappentransplantate gehört zum Bereich der plastischen, rekonstruktiven Chirurgie und es handelt sich – im Regelfall – um eine autogene Transplantation. Als Lappen wird ein körpereigenes Gewebestück mit autonomer Blutversorgung verstanden (47).

4.4.2 Einteilung

Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Lappen, ist es nicht möglich, diese anhand eines Kriteriums einzuteilen. Darum erfolgt die Einteilung anhand mehrerer Gesichtspunkte, die im Folgenden erläutert werden.

4.4.2.1 Lokalisation

Bezüglich der Distanz zum Defekt unterscheidet man lokale, regionale und Fernlappen.

Ein lokaler Lappen wird direkt an den abzudeckenden Defekt angrenzend gehoben. Dies hat den Vorteil, dass Haut- und Haarfarbe, Schichtdicke und Innervation dem Empfängergebiet entsprechen. Weiterhin ist die Hebemorbidity äußerst gering und die Anforderungen an operative Ausstattung und Fähigkeiten sind vergleichsweise niedrig. Ein Nachteil ist, dass sich weiter entfernt liegende und große Defekte nicht verschließen lassen und dass der Verlauf der Spannungslinien beachtet werden muss. Andernfalls kann zu starke Spannung im Wundgebiet zu Lappenverlust oder starker Narbenbildung führen (7, 48).

Regionale Lappen stammen aus der gleichen Körperregion, grenzen dem Wundgebiet jedoch nicht an. Dies bietet eine größere Auswahl an geeigneten Spendergebieten und wird dadurch technisch anspruchsvoller (48).

Als dritte Option kann ein Fernlappen genutzt werden, der aus einer anderen Körperregion stammt als derjenigen, in der die Wunde liegt. In Ausnahmefällen werden sie als gestielte Lappen gewonnen, bei denen die versorgenden Gefäße als Stiel intakt bleiben können. Im Regelfall werden sie als freie Lappen eingesetzt, wobei die versorgenden Gefäße durchtrennt und im Empfängergebiet wieder anastomosiert werden müssen. Die Vorteile der Fernlappen liegen in der freien Wahl der Spenderregion und damit der geweblichen Zusammensetzung und Gefäßversorgung des Lappens. So können auch tiefgehende und ausgedehnte Defekte, in deren Nachbarschaft kein geeignetes Gewebe verfügbar ist, sicher verschlossen werden. Der Nachteil liegt in den höchsten Anforderungen an Ausstattung, Personal und chirurgischen Fähigkeiten zur sicheren Durchführung der Transplantation (48, 49).

4.4.2.2 Blutversorgung

Anhand der Blutversorgung werden Lappen in *axial pattern* und *random pattern flaps* eingeteilt.

Beim zufälligen Muster wird der Lappen durch Gefäßplexus versorgt, die in einem variablen Muster das darüberliegende Gewebe versorgen (48). Da sie keinen definierten Gefäßstiel besitzen und ihr Längen- zu Breitenverhältnis begrenzt ist (je nach Region drei bis sechs zu eins), können sie nicht als Fernlappen eingesetzt werden (49, 50).

Beim axialen Muster gibt es mindestens ein versorgendes, kutanes Gefäß, an dessen Längsachse der Lappen ausgerichtet wird (51). Durchzieht das Gefäß nur die tiefe Faszie und keine tieferliegenden Strukturen, spricht man von direkten, axialen Lappen. Indirekte, axiale Lappen erhalten ihre Blutversorgung von tiefer liegenden Gefäßen, den Perforatoren. Als Perforatoren bezeichnet man Gefäße, die von größeren Gefäßen in der Tiefe abzweigen, subdermale Faszien oder Muskeln durchbohren und die Haut versorgen. Die die Gefäße einbettenden Strukturen werden mit entnommen, sodass man beispielsweise fasziokutane oder myokutane Lappen erhält. Letztere werden nach Mathes und Nathai in fünf Gruppen eingeteilt, die sich in der Anzahl von großen und kleinen versorgenden Stielgefäßen unterscheiden (52).

Eine Weiterentwicklung der axialen Lappen stellen die sogenannten Perforator-Lappen dar. Die Gewinnung dieser Lappen ist durch den technischen Fortschritt und die damit feineren Methoden der Präparation, sowie die Beschreibung der Angiosome (Gewebe-Einheit des Körpers, die von einer gemeinsamen Arterie ausgehend versorgt wird) (53) möglich geworden. Durch die Freipräparation und Nutzung der Perforatorgefäße als Blutversorgung des Lappentransplantats können Muskeln, Faszien und andere subdermale Strukturen im Spendergebiet geschont werden. Dies bedingt deutlich kleinere Hebedefekte und erschließt neue Körperregionen als mögliche Entnahmegebiete (54). Ein Nachteil stellt die längere Operationsdauer dar, die sich durch den höheren technischen Aufwand der Präparation ergibt (48).

Der Vorteil aller axialen Gefäßversorgung liegt in der freieren Gestaltung der Ausmaße des Lappens und sie ist die Voraussetzung zur Hebung von freien Lappentransplantaten (26).

4.4.2.3 Zusammensetzung, weitere Einteilung

Je nach zu deckendem Defekt besteht ein Lappen aus unterschiedlichen Geweben. Der einfache Hautlappen umfasst Haut, subkutanes Fett und die oberflächliche Faszie. Ein fasziokutaner Lappen schließt die tiefe Faszie mit ein und ein myokutaner die darunter liegende Muskulatur. Ein osseomyokutaner oder *Composite*-Lappen enthält zuletzt noch Knochen (49).

Fasziokutane Lappen eignen sich für flache und großflächigere Defekte und weisen eine geringere Hebemorbidity auf (7). Diese ist bei Muskellappen höher, jedoch ermöglichen diese die Deckung von tiefergehenden, dreidimensionalen Defekten und vermindern die bakterielle Besiedlung im Wundgebiet (55). Je nach Spenderregion kann die Hebemorbidity gesenkt werden, indem nur Teile eines Muskels gehoben werden, wenn seine Blutversorgung es zulässt (52). Neuromuskuläre Lappen

erlauben die Wiederherstellung von muskulärer Funktion im Empfängergebiet, beispielsweise als Bizeps-Ersatz (7) oder nach operativ bedingten Fazialis-Paresen (56). Der Einschluss von Knochen- oder Knorpelgewebe in den Lappen ermöglicht die Rekonstruktion von knöchernen Defekten oder Deformationen (57).

Weitere Einteilungsmöglichkeiten bieten die Art der Verpflanzung (Vorschub, Rotation, Transposition), die Art und Anzahl der Gefäßstümpfe oder der Einsatz von Gewebs-Expandern oder anderen Formen der Präfabrikation (58).

4.4.3 Einsatzgebiete in der Tiermedizin

In der Tiermedizin gehören zu den am häufigsten eingesetzten Transplantaten sogenannte *grafts*. Diese Hautsegmente unterschiedlicher Dicke werden komplett von ihrer Spenderregion gelöst und haben kein eigenes Gefäßsystem. Sie benötigen ein vorhandenes vaskuläres Bett, im Idealfall Granulationsgewebe, im Empfängergebiet und müssen die ersten 48 Stunden nach Transplantation durch Diffusion überleben (42). Ist eine solche Empfängerregion nicht gegeben, können Lappentransplantate zum Einsatz kommen.

Lokale Lappenplastiken werden häufig zur Defektdeckung eingesetzt, wenn ein Primärverschluss nicht möglich ist. Die einfachste Variante stellen Vorschublappen (*advancement flaps*) dar, die einen oder zwei Stiele haben können. Besonders der einfach gestielte Vorschublappen stellt eine sehr häufig angewandte Methode dar, da er keinen gesondert zu versorgenden Hebedefekt hinterlässt (59). Durch die höhere Elastizität der Haut der Kleintiere gegenüber der des Menschen lassen sich viele Defekte mit diesen Techniken versorgen. Falls sich am Ende des Wundrands Strukturen wie Augenlider befinden, die durch die Wundspannung verzerrt werden können, ist der Einsatz von anderen Techniken sinnvoll (59). Drehlappen (*transposition flaps*) werden in einem Winkel zum Defekt gehoben und anschließend in diesen hineinverlagert. Kleinflächige Defekte an den distalen Gliedmaßen oder größere im Kopfbereich lassen sich mit dieser Methode gut schließen.

Fernlappen werden aufgrund ihrer Nachteile in Human- und Tiermedizin nur noch selten eingesetzt. Bei einer direkten Verpflanzung erfordern sie eine längere Zwangshaltung, die von Tieren noch schlechter als vom Menschen toleriert wird. Werden sie indirekt in mehreren Schritten an ihren Zielort verbracht, macht dies mehrere Eingriffe nötig. In der Humanmedizin werden noch die *cross finger flaps* (7) eingesetzt, bei der Gewebe zwischen benachbarten Fingern übertragen wird. In der Tiermedizin kann bei Defekten im Kniebereich abdominale Haut direkt verpflanzt werden, sofern genügend überschüssige Haut vorhanden ist (59).

Die beschriebenen Methoden lassen sich unabhängig von der Blutversorgung (*random* oder *axial pattern*) durchführen. Häufiger werden in der Tiermedizin jedoch lokale und ferne, gestielte Lappen

mit axialem Muster (*axial pattern flaps*, APF) eingesetzt (45). Sie ermöglichen die Abdeckung großflächiger und tiefergehender Defekte und können dank ihrer vorhandenen Blutversorgung auch in schlecht durchbluteten Empfängerregionen eingesetzt werden (60). Häufige Indikationen sind der Verschluss chronischer Wunden und von Defekten nach Tumorentfernungen (61). Die am häufigsten eingesetzten Lappen sind der *thoracodorsal*, der *caudal superficial epigastric* und der *reverse saphenous flap*. Die APF stellen für viele Defekte eine gute Technik dar, aber im Bereich der Akren sind sie nur schwer einsetzbar (45). Hier spielen die bereits oben erwähnten Nachteile der Fernlappen eine Rolle (42).

Freie, mikrovaskuläre Lappentransplantate können die Nachteile der *grafts* und gestielten Lappen umgehen, stellen jedoch immer noch eine Rarität in der Veterinärmedizin dar. Dies ist den hohen Anforderungen an Operationstechnik und -material geschuldet (62). Hinzu kommt die Tatsache, dass sich die meisten Defekte – entsprechend der rekonstruktiven Leiter - mit einfacheren Methoden zufriedenstellend decken lassen.

Der erste experimentelle freie Lappentransfer der Tiermedizin wird 1986 von Miller beschrieben (63) und ein Jahr später erfolgreich klinisch eingesetzt (64, 65), wobei dieselben Gefäße wie für die APF verwendet werden (45). Seitdem wird der Einsatz einer Reihe weiterer kutaner, myokutaner und osseokutaner Lappen beschrieben (62, 66). Im Rahmen von Ballen-Rekonstruktionen werden auch erfolgreiche neuronale Anastomosen durchgeführt (67). Ein weiteres Einsatzgebiet kann die Deckung von Defekten im Gesichtsbereich sein, bei denen Schleimhaut und reguläre Haut benötigt werden (68). In einer retrospektiven Studie mit 57 Patienten sind die häufigsten Indikationen die Wiederherstellung traumatischer oder durch Tumorentfernung entstandener Wunden (66). Zu den am häufigsten eingesetzten Lappen gehören der *superficial cervical cutaneous flap* und der *medial saphenous fasciocutaneous flap*.

Im Gegensatz hierzu finden freie Lappentransfers in der Humanmedizin breite Anwendung, da das Prinzip der rekonstruktiven Leiter vielfach durch den sogenannten „rekonstruktiven Aufzug“ (69) ersetzt wird. Hier gilt die Vorgabe, dass Defekte nicht mit der einfachsten, sondern mit der besten Methode versorgt werden sollen.

Wie oben beschrieben, gibt es eine Vielzahl von Problemstellungen, bei denen Primärverschlüsse, lokale Transplantate oder Grafts nicht möglich sind oder schlechtere Ergebnisse erzielen (7). Beispielsweise ist es nach größeren Traumata, Verbrennungswunden oder nach Bestrahlungstherapien häufig nicht möglich, gestielte Lappen einzusetzen, da in der Nachbarschaft des Defekts kein verwendbares Gewebe vorliegt. Weiterhin lassen sich tiefgehende Defekt häufig nicht lokal decken, sondern benötigen mehr Gewebe, das beispielsweise ein latissimus-dorsi-Lappen bereitstellen kann (70). Auch *compound*-Lappen sind als freie Lappen deutlich einfacher zu heben und

ermöglichen die Rekonstruktion von komplexen Defekten, beispielsweise nach Mandibulektomie aufgrund von Tumoren der Mundhöhle (71).

Ebenfalls sind ästhetische Aspekte sowie die Wiederherstellung von Funktionalität wichtiger beim Menschen als beim Tier. Diese können meist nur mittels freien Transplantaten erzielt werden (70). Hier ist besonders die Brustrekonstruktion nach Brustkrebs-Erkrankungen hervorzuheben, bei der mit freien Lappen gute Ergebnisse zu erzielen sind (7, 70). Auch die Funktionserhaltung oder -wiederherstellung kann durch Nerven-Muskel-Lappen erreicht werden, beispielsweise nach Fazialis-Lähmungen (72).

4.4.4 Komplikationen

In der Humanmedizin verzeichnen spezialisierte Zentren Erfolgsraten bei mikrochirurgischen Lappentransfers von teilweise über 98 % (10), trotzdem kommen regelmäßig Komplikationen vor. Erneute Eingriffe (Revisionen) sind in bis zu 15 % der Fälle notwendig (73). Der erfolgreiche Abschluss eines (freien) Lappentransfers hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, die im Folgenden erläutert werden.

Der erste wichtige Faktor ist der Patient selbst: nur stabile Patienten sind für freie Lappentransfers geeignet, da es sich um Operationen von langer Dauer handelt (70); so sind durchschnittliche Operationszeiten von 12 Stunden bei aufwändigeren Rekonstruktionen nicht ungewöhnlich (71). Lese et al. können in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der ASA-Klassifikation und dem Risiko eines Lappenversagens darstellen. Die von der *American Society of Anesthesiologists* entwickelte Klassifikation teilt Patienten anhand ihrer Vorerkrankungen in sechs Risikogruppen für eine Narkose ein. Je höher die Gruppe, desto höher ist das Narkoserisiko. In der erwähnten Studie haben Patienten der Gruppe vier ein fast zwölf Mal erhöhtes Risiko für Komplikationen als Patienten der Gruppe eins (74). Weiterhin stellen Übergewicht (75) und Rauchen (69), sowie systemische Erkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (10), Diabetes mellitus (76) oder unbekannt und unbehandelte Gerinnungsstörungen (73) negativ prognostische Faktoren dar.

Nikotin verursacht auf direktem Weg Endothelschäden und eine systemische Vasokonstriktion, wodurch die kapilläre Durchblutung stark reduziert wird. Dieser Effekt ist von der Dauer und Dosis des Nikotin-Konsums abhängig, sodass eine Abstinenz von mehreren Wochen vor und nach einem Lappentransfer empfohlen wird (69). Diabetes mellitus ist ebenfalls ein bekannter Risikofaktor, der die Wundheilung beeinträchtigt. Es kommt zu chronischen Entzündungsvorgängen, gestörter Mikrozirkulation und Neuropathien und kann auf diesem Weg zum Lappenversagen führen (77). Andere Faktoren, wie hohes Alter (78), eine Anämie (79) oder eine reaktive Thrombozytose als Reaktion auf ein Trauma (80) haben nur geringen bis keinen Einfluss.

Den zweiten Faktor stellt der Defekt selbst dar, der für die Deckung durch ein freies Transplantat geeignet sein muss. So ist eine stabile, knöchernen Unterlage Voraussetzung für ein erfolgreiches Einheilen und es muss ausreichend durchblutetes Gewebe angrenzend zum Defekt vorhanden sein (70). Weiterhin müssen geeignete Anschlussgefäße vorhanden sein, um sichere mikrovaskuläre Anastomosen durchführen zu können. Vor allem bei Patienten, die eine Bestrahlungstherapie erhalten haben, stellt dies ein Problem dar. Die Strahlung schädigt das Endothel und führt zu makroskopisch sichtbarer Verdickung der Gefäße, perivaskulärer Fibrose und zu verminderten Blutfluss-Raten (81). Da die Veränderungen teils reversibel sind, wird ein mehrmonatiger Abstand zwischen der Bestrahlungstherapie und dem Defektverschluss empfohlen.

Eine kontaminierte Wunde sollte – wenn möglich - durch frühes und aggressives Débridement in eine saubere überführt werden (sogenannte „Wundrandausschneidung nach Friedrich“ (26)). Dies ermöglicht einen zeitnahen Wundverschluss und verhindert weiteren Gewebsverlust, beispielsweise durch Austrocknung (70).

Ein dritter Faktor ist der Chirurg selbst. Je größer dessen Erfahrung und besser seine Ausbildung, desto größer ist die Chance auf einen erfolgreichen Eingriff (70). Bereits bei der Planung des Transfers gibt es viele Problemstellungen, die sich bei entsprechender Erfahrung vermeiden lassen (10). Wie weiter oben erwähnt, ist bereits die Auswahl des Patienten bzw. der geeigneten Methode der Defektdeckung entscheidend. Auch der zeitliche Rahmen spielt eine Rolle, da eine zu späte Operation ebenfalls zu mehr Komplikationen führen kann (70). Weiterhin obliegt dem Chirurgen eine adäquate Defektanalyse, bei der die im vorigen Absatz beschriebenen Faktoren berücksichtigt werden müssen. Auch die Auswahl eines geeigneten Lappens hängt von der Erfahrung und technischen Fertigkeit des Operateurs ab und nicht zuletzt die Operationsdauer, die einen signifikanten Einfluss auf die erfolgreiche Transplantation hat (82). Technische Fehler führen ebenfalls häufig zu Komplikationen, vor allem bei der Entstehung von Thromben im Bereich der Anastomosen (83).

Der vierte und entscheidende Faktor ist die Perfusion des Transplantats. Diese wird einerseits von den anderen Faktoren beeinflusst, ist aber bei freien Lappen zusätzlich von der Integrität des Gefäßstiels und dessen Anastomosen abhängig. Es können venöse und arterielle Perfusionsstörungen auftreten, die durch intravasale Thromben, Gefäßspasmen oder -obstruktionen entstehen (83). Die venöse Insuffizienz ist in den meisten retrospektiven Untersuchungen mit 54 % der häufigste Grund für ein Lappenversagen und sie entsteht in 80 % der Fälle durch Thromben (48); arterielle Thromben entstehen dagegen nur halb so oft. Dies wird darauf zurückgeführt, dass im venösen System ein langsamerer Blutfluss vorliegt und Venen anfälliger für Abknicken und Kompression von außen sind (83).

In beiden Gefäßen entstehen 80 % der Thromben in den ersten beiden Tag nach der Transplantation (84). Aus diesem Grund ist eine intensive postoperative Überwachung von Patient und Transplantat wichtig und eine aggressive Herangehensweise bei Hinweisen auf Perfusionsstörungen wichtig (69). Je nach Studie konnten durch eine frühe erneute Operation zwischen 71 (83) und 85 % (74) der Lappen mit Beeinträchtigung des venösen Abflusses erhalten werden. Bei arterieller Perfusionsstörung waren es zwischen 7 und 40 %. Bui und Mitarbeiter können 60 % der arteriellen Beeinträchtigungen auf technische Fehler während der Operation zurückführen (83). Dies verdeutlicht die Bedeutung einer fehlerfreien chirurgischen Technik, besonders bei der Durchführung von Gefäßanastomosen. Dies gewinnt noch mehr an Bedeutung, da häufig keine optimale Situation der Anschlussgefäße vorliegt, beispielsweise nach einer Bestrahlungstherapie (81).

In der Tiermedizin kommen bei APF Komplikationen in bis zu 90 % der Fälle vor und umfassen Nahtdehiszenz, Nekrose oder Infektion. In 30 % der Fälle ist eine zweite Operation erforderlich. Trotzdem erreichen 93 % der Fälle eine Wundheilung und damit einen erfolgreichen Ausgang der Behandlung (61). Bei den freien Lappentransplantaten lagen die Überlebensraten der Lappen mit 93 % ähnlich hoch und es traten Nahtdehiszenzen und Infektionen als Komplikationen auf (66). In anderen Studien wurden bis zu 25 % der Lappen durch Thrombosen der versorgenden Gefäße verloren (45, 66, 67), wobei venöse Thrombosen häufiger vorkamen (66).

Bei komplikationslosem Verlauf jedoch sind mikrovaskuläre, freie Lappentransplantate anderen Versorgungsarten überlegen, da sie kürzere Klinikaufenthalte, geringere Morbiditätsraten und geringere Kosten aufweisen (85).

Zur Steigerung der Überlebensrate von Lappentransplantaten werden experimentell verschiedene Ansätze untersucht. Wenig bis keinen Effekt haben eine akute, normovolämische Blutverdünnung (86) oder der Einsatz von Dopamin als Vasodilatator (87). Der Einsatz von Simvastatin (88) oder einer Kombination aus hyperbarem Sauerstoff und Hypothermie am Transplantat (89) zeigte experimentell positive Auswirkungen, kommen klinisch aber nicht zum Einsatz. Einen weiteren Ansatzpunkt stellt die Perfusion der Transplantate dar, die entscheidend von seiner Vaskularisation abhängt. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren, besonders von VEGF, hat in experimentellen Studien einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate von Lappentransplantaten. So kann der Anteil an nekrotischen Lappen und die Zeit bis zur vollständigen Perfusion des Transplantats gesenkt werden (90, 91). Im Kapitel 4.6 werden die Vorgänge der Neovaskularisation eingehender beschrieben.

4.5 Mikrochirurgie

4.5.1 Definition und Entwicklung

Die Mikrochirurgie umfasst die chirurgischen Tätigkeiten, die mit feinen Instrumenten unter starker Vergrößerung durchgeführt werden (23). Sie findet in der Medizin in vielen chirurgischen Disziplinen Anwendung (Rekonstruktive Chirurgie, Neurochirurgie, Gynäkologie, Urologie u.a.) und ist auch die Voraussetzung für freie Transplantate. Der Begriff und die entsprechende Operationstechnik wird 1960 von Jacobson und Suarez beschrieben (92) und der Begriff „Mikrogefäß“ für Blutgefäße unter 3 mm 1967 von Cobbett (93).

Bereits 1966 gelingt Buncke und Mitarbeitern die Reimplantation eines Hasenohrs unter Verwendung mikrochirurgischen Techniken (94) und 1973 beschreiben Daniel und Taylor den ersten erfolgreichen freien Lappentransfer (95). Von Koshima wird 2000 der Begriff „Supermikrochirurgie“ für die Chirurgie an Gefäßen oder Nerven mit einem Durchmesser von unter 0,8 mm eingeführt (96).

In der Veterinärmedizin finden mikrochirurgische Methoden in verschiedenen Disziplinen seit über 30 Jahren Anwendung. Am gängigsten sind sie in der Ophthalmologie (97), finden aber auch in der rekonstruktiven Chirurgie (45), Transplantationschirurgie (98) und Urologie Verwendung (99).

4.5.2 Optische Vergrößerungshilfen

Zur Darstellung der feinen Strukturen werden Vergrößerungshilfen wie Lupenbrillen oder Operationsmikroskope verwendet. Erste Einsätze eines noch monokularen Mikroskops finden bereits 1921 durch Nylén und Holmgren in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde statt (100). Heutzutage werden bevorzugt stereoskopische Mikroskope mit koaxialer Lichtquelle benutzt, welche frei in allen Ebenen des Raums beweglich sind und bis zu 40-fache Vergrößerung ermöglichen (101).

4.5.3 Instrumentarium und Nahtmaterial

Die Handhabung feinsten Strukturen erfordert spezielle Instrumente, die ursprünglich von Uhrmacherwerkzeugen abgewandelt wurden. Heute gibt es eine Vielzahl an kommerziellen Herstellern und je nach Indikation unterschiedliche Instrumente. Zur Grundausstattung gehören Scheren, Pinzetten und Nadelhalter, welche für gefäßchirurgische Eingriffe um Dilatatorklinzetten, Gefäßklemmen und Spülkanülen ergänzt werden (10).

In der Regel wird nicht-resorbierbares Nahtmaterial verwendet, dessen Durchmesser bis unter 0,01 mm (11-0 *United States Pharmacopeia* (USP)) reicht. Gefäßnähte erfolgen mit atraumatischer Nadelspitze (10).

4.5.4 Mikrovaskuläre Anastomosen

Als Anastomose wird im medizinischen Sinn eine „natürliche [...] oder operativ angelegte Verbindung von Hohlgorganen [...] oder Blut- [...] und Lymphgefäßen“ verstanden (23).

Erste Operationen an Gefäßen werden bereits im 18. Jahrhundert beschrieben und die erste Anastomose 1899 durch Jassinowski durchgeführt (10). Im Laufe der 1960er Jahre beschreibt zunächst Jacobson die erste mikrochirurgische Anastomose (92) sowie Buncke die Anastomosierung von Gefäßen mit weniger als 1 mm Durchmesser (94). Heute finden diese Techniken vielfältige Anwendung und werden in Kursen angehenden Chirurgen vermittelt (102, 103). Sie sind die Voraussetzung zum freien Lappentransfer in der plastischen Chirurgie (26).

Es werden zwei Arten von mikrovaskulären Anastomosen unterschieden (siehe Abbildung 4-5): Die End-zu-End-Anastomose (EZE) verbindet die Enden zweier Gefäßstümpfe miteinander (10).

Bei der End-zu-Seit-Anastomose (EZS) wird ein Gefäßende an eine bestehende Gefäßachse angeschlossen.

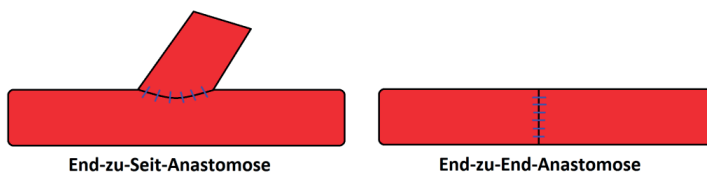


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung unterschiedlicher Anastomosen (eigene Grafik)

Die EZE stellt die häufiger verwendete Variante dar und wird bei zahlreichen mikrochirurgischen Indikationen eingesetzt. Alternativlos ist sie in der Regel bei der Replantation von Extremitäten (10). Sie eignet sich gut bei der Verbindung von Gefäßen mit ähnlichen Lumina und ist in tieferen Schichten bei engeren Platzverhältnissen einfacher durchzuführen als die EZS (49). Bei arteriosklerotischen Gefäßen ist die EZE geeigneter, da die Anastomose einen größeren Durchmesser hat und sich ein gerader Gefäßverlauf entwickelt, der weniger anfällig für eine Verlegung durch Plaques ist (104).

Die EZS ist im Allgemeinen die schonender Variante, da sie die Erhaltung von bestehenden Gefäßen im Anschlussgebiet ermöglicht. Dies ist besonders im Bereich der Gliedmaßen wichtig, da meist nur eine Haupt-Gefäßachse vorhanden ist, die – beispielsweise bei Lappentransfers - erhalten werden muss (10). Die EZS ermöglicht ein einfacheres Verbinden von Gefäßen mit unterschiedlichen Lumina und ist weniger anfällig für Gefäßspasmen, die beim Umgang mit den Gefäßstümpfen entstehen können (49). In verschiedenen, retrospektiven Studien kann kein signifikanter Unterschied bei der Durchgängigkeit von Anastomosen und dem damit verbundenen Überleben von freien Lappentransplantaten gefunden

werden (104, 105). Die dabei festgestellten Raten von arteriellen Thrombosen reichen von 0 (EZE) bis 1,15 % (EZS), venöse Thrombosen treten mit einer Häufigkeit von 0 (EZS) bis 1,35 % (EZE) auf (104). Das Versagen einer Anastomose kann systemische Gründe haben (siehe Kapitel 4.4.4), häufiger lagen jedoch technische Ursachen vor. So können durch zu groben Umgang Gefäßspasmen oder Quetschungen an den Gefäßstümpfen entstehen, die die Durchgängigkeit der Anastomose beeinträchtigen, weshalb die Gefäße nur an ihrer Adventitia manipuliert werden dürfen. Auch äußere Faktoren wie Kälte oder Trockenheit können zu Spasmen der Gefäße führen und sollten vermieden werden. Bei der Präparation der Gefäße muss darauf geachtet werden, dass Seitenäste nicht zu nah zum Hauptgefäß ligiert werden, da dieses sonst indirekter Kompression ausgesetzt sein kann. Weiterhin sollten Gefäßstümpfe gekürzt werden, falls sie innerhalb einer Traumazone liegen, da sie häufig vorgeschädigt sind. Eine zu starke Spannung auf der Anastomose – z.B. durch zu starkes Kürzen der Stümpfe – muss ebenfalls vermieden werden. Bei Durchführung der Naht muss unbedingt ein Einstechen in die hinten liegende Gefäßwand vermieden werden. Hierbei ist eine gute Darstellung der Lumina wichtig, bei der das Trimmen der Adventitia hilft. Um Verwerfungen oder Undichtigkeiten der Gefäßwand zu vermeiden, sollten die ersten Nähte einen gleichen Abstand zueinander haben (10, 49).

4.6 Neovaskularisation

Die Entstehung neuer Blutgefäße (Neovaskularisation) geschieht im Säugetierkörper auf zwei Arten, durch Angiogenese und Vaskulogenese.

Die Angiogenese beschreibt die Entstehung von neuen Blutgefäßen aus bereits vorhanden durch Abspaltung oder Aussprossung (106).

Im Rahmen der Vaskulogenese werden neue Blutgefäße *de novo* gebildet, d. h. sie gehen nicht aus bereits vorhandenen Gefäßen hervor. Stattdessen lagern sich Vorläufer von Endothelzellen zu so genannten Blutinseln zusammen und entwickeln sich zu Gefäßen weiter (107).

Diese Unterscheidung ist nicht als absolut anzusehen, da beide Prozesse über ähnliche Mechanismen und parallel ablaufen: Beiden ist die Proliferation und Migration von Endothelzellen (EZ) und endothelialen Vorläuferzellen (EPC) gemein (108).

4.6.1 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese wird bereits Ende des 18. Jahrhunderts durch den britischen Arzt John Hunter benutzt (109). Er beobachtet, dass sich das Blutgefäßsystem entsprechend den örtlichen Belastungen anpassen und vergrößern kann (110). 1852 beschreibt Meyer Kapillarsprossen, sogenannte *sprouts*, die Clark 1918 in Gefäßen mit hoher Flussgeschwindigkeit darstellen kann (109). Über einen langen Zeitraum bleibt es bei beschreibenden Publikationen in Anatomie und Embryologie. Einen neuen Anstoß bekommt das Thema durch die Forschung von Judah Folkman, der 1971 den Zusammenhang

zwischen Angiogenese und Tumorwachstum postuliert (111). Dies führt zu einem hohen Forschungsinteresse, sodass inzwischen mehrere Tausend Publikationen pro Jahr zu diesem Thema veröffentlicht werden (112).

Physiologisch gesehen ist Angiogenese ein Prozess, der bereits im Embryo stattfindet und bis ans Lebensende vorkommt. Pränatal wird das durch Vaskulogenese entstandene, rudimentäre embryonale Gefäßnetz durch angiogenetische Vorgänge weiter ausgebaut (106). Postnatal findet sie im Rahmen von Wundheilungsprozessen, sowie im Verlauf der Menstruation und Gravidität statt (106, 108).

Es werden zwei Arten von Angiogenese unterschieden (siehe Abbildung 4-6): Die sprossende (*sprouting Angiogenesis, SA*) und die spaltende (*intussusceptive Angiogenesis, IA*) Angiogenese (106), wobei die zweite Form erst seit 30 Jahren bekannt ist (113).

Die SA zeichnet sich durch die Ausbildung neuer Gefäßsprosse aus vorhandenen Kapillaren aus. Auslösend ist zunächst eine Hypoxie in einem Gewebe, die die hypoxischen Zellen zur Ausschüttung von proangiogenen Faktoren (VEGF u.a.) anregt. Diese Faktoren bewirken in benachbarten Blutgefäßen eine erhöhte Permeabilität, eine Vasodilatation und das Aussprossen (112). Zunächst entwickeln sich EZ der Gefäßwand zu so genannten Spitzenzellen oder *tip cells*, die das distale Ende des neuen Gefäßsprosses bilden. Sie bilden multiple, haarförmige Ausläufer, die mit einer Vielzahl an VEGF-Rezeptoren besetzt sind und so dem VEGF-Gradienten folgen können (114). Zusätzlich sondern sie Proteasen ab, die die extrazelluläre Matrix auflösen und so den Weg für das Gefäß ebnen (115). Proximal der Spitzenzellen liegen die Stielzellen oder *stalk cells*, die den Körper des neuen Blutgefäßsprosses bilden. Sie ermöglichen durch Proliferation das Längenwachstum, welches durch die Migration der Spitzenzellen vorgegeben wird und mehrere Millimeter pro Tag beträgt. Innerhalb der Stielzellen bilden sich Vakuolen, durch deren Vereinigung das neue Gefäßlumen gebildet wird (112). Die Unterscheidung in die verschiedenen Zelltypen erfolgt über Liganden-Rezeptor-Interaktionen. Die Bindung von VEGF an seinem Rezeptor (VEGFR) führt zur Produktion des Liganden Delta-like-4 (Dll4) in den Spitzenzellen. Dieser bindet an den benachbarten Stielzellen am *notch*-Rezeptor und führt dort zur Unterdrückung der VEGFR-Expression (116).

Gegen Ende des Prozesses vereinigen sich die Gefäßsprosse im Bereich der höchsten VEGF-Konzentration und ermöglichen eine Blutzirkulation. Sobald das Gewebe wieder eine ausreichende Perfusion erfährt, sinken die VEGF-Konzentrationen auf ein normales Niveau (112). Im Laufe der Embryonalentwicklung spielt die SA bei der Ausbildung des Gefäßnetzes vieler Organe eine Rolle, vor allem des Gehirns (106).

Als IA beschreibt man das Auftrennen einer vorhandenen Kapillare in zwei neue Gefäße. Nach Burri läuft dieser Vorgang in vier Phasen ab. In Phase eins proliferieren die EZ der gegenüberliegenden Kapillarwände, treten intraluminal in Kontakt und bilden so eine Endothelbrücke. In Phase zwei ändern sich die Zellkontakte der EZ derart, dass ein Hohlraum in der Endothelbrücke entsteht. In der dritten Phase füllt sich dieser mit Myofibroblasten und Perizyten. Phase vier bildet den Abschluss mit Umstrukturierung der ausgefüllten Endothelbrücke zu einer transkapillären Säule aus Bindegewebe. Diese als *pillar* bezeichnete Struktur teilt den Blutstrom nun effektiv in zwei neue Gefäße auf (117). Die IA tritt vor allem embryonal auf, wo sie der Vergrößerung und Verzweigung des Blutgefäßsystems dient. Da sie weniger auf der Proliferation von EZ beruht, sondern mehr auf deren Umorganisation, stellt sie für die limitierten Ressourcen des Embryos einen effizienten und zügigen Prozess dar (112). Postnatal wurde sie in verschiedenen Organen nachgewiesen, z.B. in Drüsengewebe, Darmmukosa, Nieren, Ovarien und Uterus, aber auch in Skelettmuskulatur, Herz und Gehirn (118). Über die Regulation der IA ist vieles noch unbekannt (119). Auslösende Faktoren scheinen aber erhöhter Blutdruck und – wie bei der SA – VEGF zu sein.

Welche Angiogeneseform vermehrt aktiviert wird, scheint von Verteilung und Ausschüttungsrate von VEGF abhängig zu sein. Eine diffuse und langsame Ausschüttung aktiviert die spaltende, eine rasche und fokale konzentrierte die sprossende Angiogenese (118). Somit spielt die SA eine wichtige Rolle bei der Erschließung hypoxischer Gewebe und Ausbildung von neuen Kapillaren und die IA bewirkt das Vergrößern und Strukturieren eines bereits vorhandenen Gefäßnetzwerks.

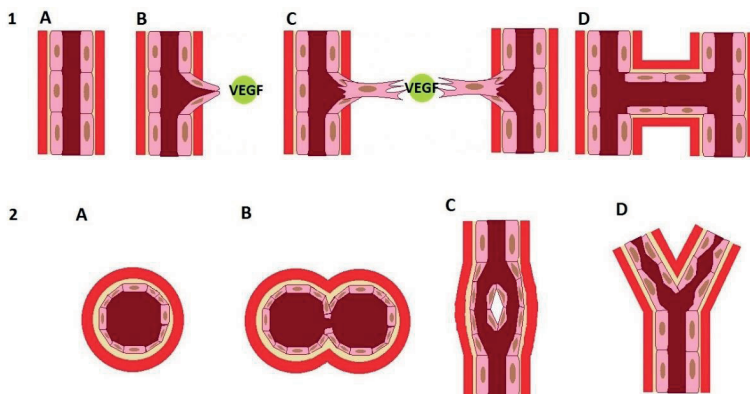


Abbildung 4-6: **1** Sprossende Angiogenese. **A** Endothel-Aktivierung und Auflösung der Basalmembran. **B** Differenzierung von Stiel- und Spitzenzellen. **C** Migration der Gefäßsprosse entlang des VEGF-Gradienten. **D** Vereinigung der Gefäßsprosse.

2 Spaltende Angiogenese. **A** Endothel-Aktivierung. **B** Wachstum und Proliferation endothelialer Säulen in das Gefäßlumen. **C** Vereinigung der Endothel-Säulen. **D** Aufzweigung in zwei Tochtergefäße (modifiziert nach (116))

4.6.2 Vaskulogenese

Unter dem Vorgang der Vaskulogenese wird bis in die 1990er Jahre nur die Bildung der embryonalen Blutgefäße verstanden. Dabei entwickeln sich zu Beginn der Embryonalphase (um den 18. Tag nach Befruchtung) die Blutinseln im Dottersack aus mesodermalen Zellen. Aus diesen gehen sowohl die Vorläufer der Blutzellen (Hämozytoblasten), als auch die der Endothelzellen (Angioblasten) hervor. Die Angioblasten migrieren in den Körper des Embryos und seine Organanlagen, bilden dort die ersten Gefäßstränge aus einfachem Endothel und Mesenchymzellen aus der Umgebung danach die Gefäßwand. Das Auswachsen der Angioblasten zu Blutgefäßen wird durch VEGF u. a. Wachstumsfaktoren stimuliert. Die weitere Verzweigung des Gefäßnetzes findet über die Mechanismen der Angiogenese statt (120, 121).

Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass auch im adulten Säugetier Vaskulogenese stattfindet (108). Diese Annahme stützt sich auf die Entdeckung von EPC, die im Blut zirkulieren und in neue Blutgefäße eingebaut werden (11). So können Tepper und Kollegen (122) im Ischämie-Modell an der Maus die Rekrutierung von EPC aus dem KM in neu gebildete Gefäße nachweisen, wobei Ischämie als auslösender Faktor für die Gefäßneubildung identifiziert wird. Durch die Ischämie eines Gewebes werden dort Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt (u. a. VEGF), die systemisch eine Mobilisation von EPC aus dem KM in die Zirkulation und lokal eine Veränderung des Gefäßendothels bewirken. Die nun zirkulierenden EPC können sich so leichter am Endothel anlagern und durch dieses ins umliegende Gewebe auswandern. Dort bilden sie den embryonalen Blutinseln ähnliche *cluster* und proliferieren. Entlang des Ischämiegradienten bilden sich Endothelstränge aus, die sich mit den vorhandenen Blutgefäßen verbinden (117, 122).

Da die Vorgänge der Vaskulogenese sowohl bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, als auch bei pathologischen wie dem Tumorwachstum beobachtet werden, gilt insbesondere der Erforschung der endothelialen Vorläuferzellen (EPC) eine große Aufmerksamkeit (123, 124).

4.7 Endotheliale Progenitorzellen

4.7.1 Definition und Geschichte

Im engeren Sinn werden unter endothelialen Vorläuferzellen jene Zellen verstanden, welche sich zu Endothelzellen entwickeln können und so bei der Neovaskularisation durch Angiogenese und Vaskulogenese mitwirken (11).

Erste Hinweise, dass solche Zellen im adulten Säugetierorganismus existieren, findet man bereits in den 1950er Jahren. Damals entdeckt man, dass künstliche Gefäßtransplantate nach ihrer Transplantation von Endothel-ähnlichen Zellen ausgekleidet werden (125). Als Ursprung wird die Existenz von Zellen vermutet, die sich im adulten Säugetier zu funktionalen Blutgefäßen entwickeln können; ähnlich den Hämangioblasten der Embryonalentwicklung (126). 1997 gelingt Asahara und

Mitarbeitern die Isolation von Zellen mit diesen Eigenschaften aus dem peripheren Blut und er vermutet in ihnen endotheliale Vorläuferzellen (11).

Seitdem hat sich jedoch eine Kontroverse über die Erforschung der EPC und ihrer möglichen Anwendungen entwickelt. Dies ist widersprüchlichen Studienergebnissen und den unterschiedlichen Definitionen von EPC geschuldet (127). Heute werden unter dem Begriff EPC auch Zellen verstanden, die die Neovaskularisation positiv beeinflussen, ohne sich selbst zu EZ zu entwickeln (128).

4.7.2 Gewinnung und Einteilung

Im Sinne dieser breiteren Definition werden drei Arten von EPC nach der Methode ihrer Gewinnung unterschieden, deren Schritte ähnlich ablaufen: Zunächst werden mononukleäre Zellen aus menschlichem, adultem peripherem oder Nabelschnur-Blut isoliert. Danach werden sie in Zellkultur vermehrt und abschließend auf ihre Verwandtschaft zu EZ untersucht.

Eine einfachere Isolation über die Darstellung von Antigenen war bis jetzt nicht erfolgreich, da noch kein EPC-spezifisches Antigen gefunden werden konnte. Alle bisher untersuchten Antigene (CD34, 45, 105 u.a.) werden von anderen hämatopoetischen oder Blutzellen geteilt (128).

4.7.2.1 *Circulating angiogenic cells (CAC)*

Die aus dem Blut isolierten Zellen werden auf mit Fibronectin überzogenen Platten ausgebracht und in Nährmedien (z.B. *endothelial growth medium 2*) mit Wachstumsfaktoren (VEGF, *fibroblast growth factor 2* (FGF2) u.a.) kultiviert. Nicht-anhaftende Zellen werden nach vier Tagen verworfen und die restlichen auf ihre Ähnlichkeit zu EZ geprüft. Diejenigen, die endotheliale (VEGFR-2) und Vorläuferzell-Marker (CD34, CD133) aufweisen, *acetylated-low density lipoprotein* (ac-LDL) (129) aufnehmen und *Ulex europaeus agglutinin-1* lectin (UEA-1) binden (130), werden als EPC definiert (11).

Diese Methode ähnelt der ursprünglich von Asahara beschriebenen am meisten (128), weist jedoch folgende Probleme auf.

Erstens sind auf den Kulturplatten häufig Thrombozyten als Kontamination vorhanden. Diese produzieren Membranproteine, die sich an die vermeintlichen EPC anlagern. Da reguläre EZ und Thrombozyten viele gleiche Membranproteine besitzen, ist eine sichere Selektion möglicher EPC nicht möglich; es lässt sich nicht mehr unterscheiden, ob die anhaftenden Zellen ihre Ähnlichkeit zu EZ selbst hervorrufen oder nur durch Thrombozyten erworben haben (131).

Zweitens lagern sich auch Monozyten auf Fibronectin-beschichteten Kulturplatten an (132) und besitzen ebenfalls viele Eigenschaften von EZ (133), sodass eine Unterscheidung schwierig wird.

Da diese Zellen trotzdem angiogenetische Eigenschaften aufweisen, werden sie als zirkulierende, angiogenetische Zellen bzw. *circulating angiogenic cells* (CAC) bezeichnet (128). Im Gegensatz zu *colony-forming unit endothelial cells* (CFU-EC) bilden CAC in Kultur keine Kolonien (134).

4.7.2.2 *Colony-forming unit endothelial cells (CFU-EC)*

Wie die CAC werden die aus dem Blut isolierten Zellen zunächst auf mit Fibronectin überzogenen Platten kultiviert. Nun werden die nicht-anhaftende Zellen nach zwei Tagen abgesammelt und erneut ausgebracht. Nach fünf bis neun Tagen entstehen Kolonien, die mittig runde und außen spindelförmige Zellen enthalten (128, 135). Auch hier wird die Verwandtschaft zu EZ geprüft.

Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen jedoch auch die CFU-EC keine EPC im engeren Sinne zu sein, da sie sich auf Ebene der Gen-Expression deutlich von EZ unterscheiden (136), in vitro kaum proliferatives Potenzial zeigen (128) und in vivo keine neuen Gefäße bilden können (137). Es scheint allerdings einen Zusammenhang zwischen niedrigen CFU-EC-Zahlen und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu geben (135).

4.7.2.3 *Endothelial colony forming cells (ECFC)*

Auch für die dritte Methode werden mononukleäre Zellen aus humanem peripherem oder Nabelschnur-Blut isoliert und auf Kollagen-beschichteten Platten ausgebracht. Nach bis zu drei Wochen werden anhaftende Kolonien von endothelialen Zellen sichtbar (138). Diese weisen typische Antigene von Endothelzellen auf, bilden gefäßähnliche Strukturen in künstlichen Matrizen (Matrigel) und in immundefizienten Mäusen (139) und besitzen unterschiedlich stark ausgeprägtes proliferatives Potenzial (138). In präklinischen Studien konnte der Einbau dieser Zellen in neu gebildete Blutgefäße bei Ischämie (140), Herzinfarkt (141), Retina-Ischämie (128) und Inselzelltransplantation (142) gezeigt werden. Zum aktuellen Forschungsstand erfüllen diese endothelialen, kolonieformenden Zellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC) genannten Zellen die Definition einer „echten“ EPC am ehesten (128).

Da CAC und CFU-EC in vielen Studien positiven Einfluss auf die Neovaskularisation genommen haben (143, 144), werden sie auch als proangiogene Zellen (*proangiogenic cells*, PAC) bezeichnet. Ihre Wirkung scheint nicht durch direkte Differenzierung zu EZ zu erfolgen, sondern über parakrine Mechanismen abzulaufen (145).

4.7.3 Funktion und Einsatz

Die Funktion der EPC wird hypothetisch so dargelegt: Kommt es zu einem vaskulären Insult, werden EPC aus dem KM freigesetzt und gewebständige EPC aktiviert (146). Zunächst bereiten die PAC die Neovaskularisation durch die Schaffung eines „proangiogenen“ Umfelds vor (127). Durch die Ausschüttung parakriner Faktoren werden ECFC rekrutiert und bewirken die eigentliche Neovaskularisation oder Endothel-Reparatur (147).

Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass der Einsatz beider Zelltypen *in vivo* zu besseren Ergebnissen führt als die getrennte Applikation (140).

Diese Funktion üben EPC in verschiedenen Situationen aus. Bei der Wundheilung (siehe oben) werden sie nach ihrer Mobilisation in das Wundgebiet integriert und tragen zur Neovaskularisation bei (148). Nach vier Tagen sind sie in den Blutgefäßen von Hautwunden nachweisbar (149) und beschleunigen die Wundheilung bei Diabetes (150). Eine unzureichende EPC-Mobilisation ist mit chronischen Wunden assoziiert (151).

Bei pathologischer Betrachtung sind EPC an onkologischen Prozessen beteiligt, da Tumore ohne Bildung eines Gefäßnetzwerks nicht größer als 1 mm³ wachsen und keine Metastasen bilden können (111). Die aktive Mitwirkung von EPC an der Neovaskularisation von Tumoren kann in etlichen Studien gezeigt werden (152–154) und deshalb sind sie Gegenstand der Untersuchung möglicher antineoplastischer Therapien (155, 156).

EPC werden in einer Vielzahl an Tiermodellen mit unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht. So kann auch bei lokalen Lappen in unterschiedlichen Studien ein positiver Effekt der EPC gezeigt werden. Kubota und Mitarbeiter beschreiben, dass eine subkutane Injektion von EPC in lokale Lappen mit zufälligem Muster zu weniger Nekrose und einer erhöhten Kapillar- und Gefäßdichte führt (13). Ähnliche Beobachtungen machen Xie et al., die nach subkutaner Injektion von EPC in lokale Lappen bei Mäusen weniger Nekrose und eine erhöhte Perfusion nachweisen konnten (17).

Zum klinischen Einsatz am Menschen kommt es bisher zu einer Vielzahl an Versuchen, jedoch hauptsächlich bei anderen Fragestellungen. So können positive Effekte bei Herzinfarkten, Schlaganfällen, Ischämie der Extremitäten oder peripherer Verschlusskrankheit nachgewiesen werden (157). Zum routinemäßigen Einsatz von EPC im klinischen Alltag oder klinischen Studien mit Lappentransplantaten ist es bisher allerdings nicht gekommen. Dies ist vermutlich der Kontroverse um eine eindeutige Definition der EPC geschuldet, die eine Vergleichbarkeit von Studien erschwert (157).

In der Veterinärmedizin finden EPC noch keine Anwendung, aber andere Stammzellen werden bei Pferden und Kleintieren eingesetzt. In der Regel handelt es sich um mesenchymale Stammzellen aus dem patienteneigenen Fettgewebe. Diese werden nach Aufbereitung verwendet und kommen teilweise mit Adjuvantien wie plättchenreichem Plasma (*platelet rich plasma*, PRP) zum Einsatz (158). So können Upchurch und Mitarbeiter eine Reduktion von Lahmheit und Schmerz nach intraartikulärer Applikation von mesenchymalen Stammzellen bei Hunden mit Hüftgelenksarthrose nachweisen (159). Insgesamt gibt es eine Vielzahl an Studien zur Stammzelltherapie in der Tiermedizin (160, 161), allerdings gibt es kaum Regelungen zum Einsatz von Stammzellen (158).

5 Material und Methoden

5.1 Material

Antikörper

Maus Anti-Ratte Cluster of Differentiation 31 (CD31), MCA1334G	Bio-Rad Laboratories Gesellschaft mit beschränkter Haftung (GmbH), München, Deutschland
Anti-Maus Immunglobulin G (IgG), BA 2001	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
Maus Anti-Ratte PCNA, PC10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ziege Anti-Maus IgG, STAR117D488GA	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Chemikalien

Antikörper-Verdünnungsmittel	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Destilliertes Wasser	Merck Kommanditgesellschaft auf Aktien (KGaA), Darmstadt, Deutschland
Diaminobenzidin plus K3468	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Entellan, Schnell-Eindeckmittel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Y-Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethyl-Methyl-Keton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyde 25 %	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Histoplast-Paraffin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Peroxidase-Blocking Solution S202398-2
Resin PU4ii
Target-Retrieval-Solution K800421-2
Vectastain PK 6100

Xylol

Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
VasQtec, Zürich, Schweiz
Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Vereinigte
Staaten von Amerika
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Geräte

Ausgießstation Histocentre 2
Brutschrank Typ T 5042
Dampfgarer Multi Gourmet
Einbettautomat Excelsior
Einmalrasierer
Elektrochirurgie VIO 100 C

Feinvakuum-Coater Leica EM ACE200
Gefriertrocknung Alpha 1-4
Heizkissen SHK 18 P10
Mikroskop-Kamera KP-FD 14 OF-S3

Mobiles Bodenstativ F12 I
Narkosegerät Uni Vet Porta

Fotomikroskop Axiophot
Pulsoximeter N-550
Rasterelektronenmikroskop Philips
ESEM XL-30
Scherggerät GT 608 Isis

Schnittmikrotom Jung SM 2000R
Stereomikroskop M80
Stereomikroskop MZ12
Streckbad-Platte Kombination

Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland
Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Braun GmbH, Kronberg, Deutschland
Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland
Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland
Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen,
Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Christ GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland
Hitachi Kokusai Electric Europe GmbH, Neu-
Isenburg, Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Groppler Medizintechnik, Deggendorf,
Deutschland
Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Medtronic GmbH, Meerbusch, Deutschland
Philips Nederland B.V., Eindhoven, Niederlande

B. Braun Melsungen Aktiengesellschaft (AG),
Melsungen, Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland

Waage Ultrascale MB SC-55

My Weigh Europe, Erkelenz, Deutschland

Instrumente

Anatomische Pinzette BD220R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Approximatorklemme mit Rahmen
ABB-1A

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Approximatorklemme mit Rahmen
ABB-1V

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Arterienklemme B-1A

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Arterienklemme BH109R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Arterienklemme BH111R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Bipolare Pinzette 20195-036

Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen,
Deutschland

Einmalskalpell „Feather“, Nr. 11

pfm Produkte für die Medizin AG, Köln,
Deutschland

Einmalskalpell „Feather“, Nr. 21

pfm Produkte für die Medizin AG, Köln,
Deutschland

Gefäßdilator D-5a.1

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Gummiringe

Werner Dorsch GmbH, Münster, Deutschland

Inzisionsschere BC503R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Irisschere 02.20.11

Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland

Klemmenanlegepinzette CAF-4

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Klemmdose CB-1

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Mikro-Federschere ATS 1410

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Mikro-Pinzette 07.61.11

Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland

Nadelhalter CS-14

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Nadelhalter Durogrip BM013R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Pinzette JF-3-18

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Präparierschere 02.50.13

Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland

Schere 72-8491

Harvard Apparatus, Holliston, Vereinigte Staaten
von Amerika

Stahlmaßstab AA804R

Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Stoßnadeln

ExaClair GmbH, Köln, Deutschland

Venenklemme B-1V

S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Wundhaken

Eigenbau aus Draht

Medikamente

Baytril 2,5 %

Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

Fragmin P 2500 Internationale
Einheiten (IE)

Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland

Isotonische Kochsalzlösung

Carefusion Germany 318 GmbH, Heidelberg,
Deutschland

Ketavet

Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland

Medunasal-Heparin 500 IE

Sintetica GmbH, Aschaffenburg, Deutschland

Narcofen

Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

Forene

AbbVie GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Paveron N

Linden Arzneimittel-Vertrieb-GmbH,
Heuchelheim, Deutschland

Rimadyl

Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland

Rompun 2 %

Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

Temgesic

Indivior Eu Ltd., Slough, Großbritannien

Nahtmaterial

Ethilon 10-0 BV 100-4

Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Ethilon 8-0 BV-2

Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Monocryl 4-0 PS-2

Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Programme

Carl Zeiss Vision KS 300 3.0

Carl Zeiss International GmbH, Aalen, Deutschland

Diskus – Mikroskopische Diskussion

Hilgers Technisches Büro, Königswinter,
Deutschland

Gimp – GNU Image Manipulation
Program

Frei erhältlich unter www.gimp.org

Scandium Imaging

EMSIS GmbH, Münster, Deutschland

Sigma Plot mit Sigma Stat-Erweiterung

Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

BMDP Statistical Software

StatSols, Cork Irland

Sonstige

Augensalbe Bepanthen	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Chirurgische Maske The Lite One	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Chirurgisches Netz, Prolene	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Deckgläser	Knittel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Desinfektionsspray Octeniderm farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fixierpflaster Leukosilk S	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Hautmarker Securline 1000-00-PDG	Aspen Medical Europe Ltd., Worcestershire, Großbritannien
Kanüle Microlance 3: 0,9 * 40 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kanüle Microlance 3: 0,7 * 30 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kanüle Microlance 3: 0,45 * 13 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
VMK EndoNeedle 0,35 * 25 mm	Vedefar nv, Dilbeek, Belgien
Knopfkanüle 2 * 80 mm	Unimed SA, Lausanne, Schweiz
Knopfkanüle 0,6 * 30mm	HERO GmbH, Berlin, Deutschland
Latex-Handschuhe Supreme	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Mullkompressen 10 * 10 cm	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Objektträger Super Frost Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Operations (OP) -Mantel Eclipse	Medline International Germany GmbH, Kleve, Deutschland
OP-Abdecktuch OPS Essential 75 * 75 cm	Medline International Germany GmbH, Kleve, Deutschland
OP-Abdecktuch OPS Essential 45 * 40 cm	Medline International Germany GmbH, Kleve, Deutschland
OP-Abdecktuch mit Fenster OPS Essential 45 * 50 cm	Medline International Germany GmbH, Kleeve, Deutschland
Probenteller	Baltic-Präparation, Niesgrau, Deutschland
Schlinggazetupfer 15 * 15 cm	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Spritze Omnifix-F Solo 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Spritze Injekt Solo 2 ml

Spritze Injekt Solo 5 ml

Sputter-Gold-Target

Wägeschalen

Wattekügelchen Roeko Größe 0

Wattekügelchen Roeko Größe 000

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Baltic-Präparation, Niesgrau, Deutschland

Llg GmbH, Meckenheim, Deutschland

Coltène / Whaledent AG, Altstätten, Schweiz

Coltène / Whaledent AG, Altstätten, Schweiz

5.2 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Studie wurden 15 männliche Wistarratten und 121 männliche, athymische Nacktratten (Hsd: RH-Foxn1^{tmu}) mit einem Mindestgewicht von 350 g und einem durchschnittlichen Alter von 15 Wochen verwendet, die von der Firma Harlan Laboratories bezogen wurden. Die Tiere wurden nach den gesetzlichen Vorgaben unter konstanten Bedingungen (12-Stunden-Tag- / 12-Stunden-Nacht-Rhythmus, $21 \pm 4^\circ$ Celsius Raumtemperatur, $45 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit) paarweise in Käfigen gehalten, in denen sie ständigen Zugang zu Wasser und Standardfutter für Ratten hatten.

Postoperativ wurden die Tiere einzeln gehalten, um eine Wundmanipulation durch das Partnertier zu verhindern. Ebenfalls wurden statt Einstreu Papiertücher bis zum Wundverschluss verwendet, um die Gefahr von Infektionen zu verringern.

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland und unter der Genehmigung des zuständigen Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz in Koblenz durchgeführt (Genehmigungs-Nr. 23 177-07/G 12-1-091).

Von den Tieren wurden 40 zur Etablierung der OP-Methode, zehn zur Etablierung der Perfusions-Methode, 37 im Rahmen des Vorversuchs und 49 im Rahmen des Hauptversuchs eingesetzt.

5.3 Versuchsaufbau

5.3.1 Etablierung der Methoden

Als Vorarbeit wurden die OP- und Perfusionsmethoden an 40 bzw. zehn Tieren etabliert. Zunächst wurde die Durchführung von mikrovaskulären Anastomosen an 15 Tieren eingeübt, bevor an 25 Tieren die Operationsmethode erlernt wurde.

Die Wahl des Lappen-Modells fiel auf den von Miyamoto et al. (162) beschriebenen Pectoralis-Hautlappen. Dieser versprach gegenüber dem häufiger verwendeten Modell des oberflächlichen epigastrischen Lappens eine einfachere Durchführung und eine geringere Komplikationsrate von 20 % (162). Im Rahmen der Etablierung des Modells wurden Änderungen an der OP-Methode vorgenommen, die weiter unten beschrieben werden (163).

Die üblicherweise verwendete Methode zur Herstellung von Gefäßausguss-Präparaten (*corrosion casts*) bei der Maus über das rechte Atrium (164) konnte für die geplanten Untersuchungen nicht verwendet werden. Da Ratten ein größeres Blutvolumen und Gefäßnetzwerk haben, konnte keine komplette Perfusion der Tiere über eine atriale Perfusion erreicht und keine Präparate der operierten Lappen gewonnen werden. Die für diese Arbeit modifizierte Methode musste erst etabliert werden und wird weiter unten beschrieben.

5.3.2 Vorversuch

In einem Vorversuch wurden die Auswirkungen des Entnahmezeitpunkts auf die Durchführbarkeit der Methoden und die Entwicklung der Gefäßarchitektur in den Transplantaten untersucht. Hierfür wurden 24 Tiere in drei Gruppen zu acht Tieren aufgeteilt und erhielten in einem Eingriff ein mikrovaskuläres, autogenes Fernlappentransplantat. Ein Hautlappen aus der rechten *regio pectoralis* wurde in die rechte *regio inguinalis* transplantiert, wobei die versorgenden Gefäße erhalten und mit den Femoralgefäßen anastomosiert wurden. Den Gefäßstiel des Präparats bildeten die *Arteria (A.)* und *Vena (V.) thoracica longa*.

Aus jeder Gruppe wurden vier Tiere für die Entnahme von histologischen Gewebeproben und vier Tiere für die Perfusion ausgewählt. Die Operation erfolgte an Tag null und die Entnahme der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Tiere der Gruppe 1 wurden an Tag drei, der Gruppe 2 an Tag sieben und der Gruppe 3 an Tag zwölf beprobt. Zusätzlich wurde von jedem Tier ein Hautlappen aus der linken *regio inguinalis* entnommen, der in Lage und Größe dem entnommenen Transplantat entsprach. Dieser diente als Kontrolle.

5.3.3 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden 36 Tiere in drei Gruppen zu zwölf Tieren aufgeteilt und erhielten in einem Eingriff ein mikrovaskuläres, autogenes Fernlappentransplantat. Ein Hautlappen aus der rechten *regio pectoralis* wurde in die rechte *regio inguinalis* transplantiert, wobei die versorgenden Gefäße erhalten und mit den Femoralgefäßen anastomosiert wurden. Den Gefäßstiel des Präparats bildeten die *A.* und *V. thoracica longa*.

Tiere der Gruppe 1 (Kontrolle) erhielten keine endotheliale Vorläuferzellen (EPC), Gruppe 2 (EPC i.a.) erhielt intraoperativ eine intraarterielle Instillation von 600 µl EPC-Suspension und Gruppe 3 (EPC s.c.) erhielt intraoperativ eine subkutane Injektion von 600 µl EPC-Suspension.

Aus jeder Gruppe wurden sechs Tiere für die Entnahme von histologischen Gewebeproben und sechs Tiere für die Perfusion ausgewählt.

In Tabelle 5.1 ist eine Übersicht über Gruppengröße, Behandlungsart und Art der Probenentnahme dargestellt.

	Gruppe 1 (Kontrolle)	Gruppe 2 (EPC i.a.)	Gruppe 3 (EPC s.c.)
Histologie	6	6	6
Perfusion	6	6	6
Summe	12	12	12

Tabelle 5-1: Gruppengröße bei den Behandlungsmodalitäten. EPC = endotheliale Vorläuferzellen, i.a. = intraarteriell, s.c.= subkutan

Die Operation erfolgte an Tag null und an Tag sieben die Entnahme der histologischen Proben bzw. die Perfusion in Narkose und die Abtötung der Tiere. Der Verlauf der Wundheilung wurde fotografisch jeden zweiten Tag dokumentiert.

5.3.4 Aufbereitung der Endothelialen Progenitorzellen

Mononukleäre Zellen (*mononuclear cells*, MNC) wurden durch Dichtezentrifugation aus humanem peripherem Blut gewonnen. Dafür wurden 12,5 ml Blut mit 12,5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) verdünnt. Nach Zugabe von 15 ml Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) erfolgte eine Zentrifugation bei 800 g für 20 Minuten. Die MNC befanden sich nun in einer Interphase zwischen den Schichten und wurden mit einer Pipette in ein Falcon-Gefäß mit 50 ml PBS überführt. Darauf erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 800 g für zehn Minuten und anschließendem Verwerfen des Überstands. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Zellen in einer Konzentration von $8 \cdot 10^6$ EPC/ml EPC-Medium in mit Fibronectin beschichtete T-75 Zellkulturflaschen überführt. Diese wurden 72 Stunden ohne Wechsel des Mediums bei 37° C Temperatur, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden nicht-anhaftende Zellen mit PBS abgewaschen und die adhärenenten EPC mit 0,5 % Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) abgelöst und verwendet. Die eingesetzte Lösung enthielt zwei Millionen EPC pro Milliliter Lösungsmittel.

5.3.5 Operation

Die Eingriffe wurden in Narkose durchgeführt: Die Einleitung erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin, die Erhaltung durch Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemischs in einer Konzentration von 0,8 bis 1,5 % und einer Flussrate von 500 ml/h. Die intraoperative Analgesie wurde mit 0,05 mg/kg Buprenorphin s.c., die Antikoagulation mit 700 IE/kg Dalteparin s.c. und eine perioperative Antibiose mit 7,5 mg/kg Enrofloxazin durchgeführt. Herz- und Atemfrequenz wurden während des Eingriffs regelmäßig kontrolliert.

Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmematte im Operationsbereich positioniert und an den Gliedmaßen mit Klebestreifen fixiert (siehe Abbildung 5-1 A). Es erfolgte eine Rasur, Reinigung und Desinfektion der Operationsfelder in der rechten *regio pectoralis* und *inguinalis*, eine subkutane Infusion von 2 ml steriler Kochsalzlösung und das Auftragen von Bepanthen-Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen).

In der rechten *regio pectoralis* wurde ein 4*1,5 cm großer, elliptischer Hautlappen sowie der distale Verlauf der *V. thoracica longa* markiert (siehe Abbildung 5-1 B). Nach Inzision des medialen Präparat-Rands und Durchtrennung des *Musculus panniculus carnosus* erfolgte die stumpfe Präparation der

Brustmuskulatur. *Musculus (M.) pectoralis maior* und *minor* wurden stumpf getrennt und mit Wundhaken wurde das Operationsfeld dargestellt (siehe Abbildung 5-1. C).

Die folgenden Schritte wurden unter einem Stereomikroskop (Stereomikroskop M80, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit 7,5 – 60-facher Vergrößerung durchgeführt.

Nun erfolgte die Präparation des proximalen Anteils von *Arteria* und *Vena axillaris* mit den Abzweigungen der *A.* und *V. thoracica communis*; diese bildeten den späteren Gefäßstiel des Transplantats (siehe Abbildung 5-1. D). *A.* und *V. thoracica lateralis* wurden ligiert und abgesetzt und der laterale Rand des Transplantats umschnitten.

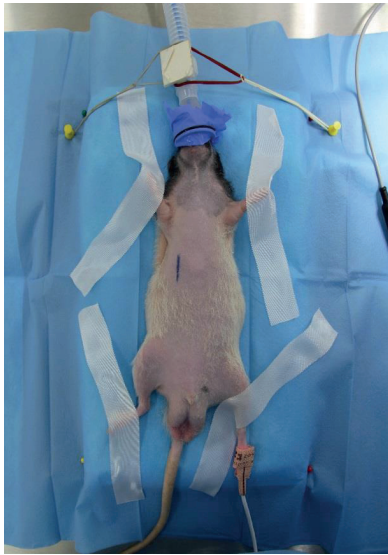
Um die Ischämie-Zeit des Transplantats möglichst kurz zu halten, erfolgte als nächstes die Präparation des Empfängergebiets. In der rechten *regio inguinalis* wurde ein 4*1,5 cm, elliptischer Hautlappen markiert und eine mittige Inzision auf gesamter Länge durchgeführt (siehe Abbildung 5-2. A). Durch stumpfe Präparation wurde das inguinale Fettpolster freigelegt, das danach eingeschnitten und zur Seite gelegt wurde (siehe Abbildung 5-2 B). Das OP-Gebiet wurde mit Wundhaken erweitert und *A.* und *V. femoralis* aus der Adventitia präpariert; die lateral abgehenden Gefäße wurden ligiert und abgesetzt (siehe Abbildung 5-2. C).

Nun erfolgte die abschließende Lappenhebung durch Ligatur und Absetzen der *A.* und *V. thoracica communis* an der *A.* bzw. *V. axillaris*. Das Transplantat wurde mit steriler Kochsalzlösung feucht gehalten und in die *regio inguinalis* verbracht.

Der Blutfluss an der Anastomose-Stelle wurde durch Anbringen einer Approximatorklemme an der *A. femoralis* unterbrochen und anschließend ein ellipsoider, ca. 1 mm langer und bis in das Lumen reichender Einschnitt in die Gefäßwand vorgenommen (siehe Abbildung 5-2. D). Nun erfolgte eine End-zu-Seit-Anastomose mit sechs bis acht Einzelheften (Ethilon 10-0 BV 100-4, Ethicon, Norderstedt), je nach Gefäßgröße.

Bei den Tieren der Gruppe 2 wurden vor Abschluss der Anastomose 600 µl EPC-Suspension in den arteriellen Gefäßstumpf des Lappentransplantats instilliert.

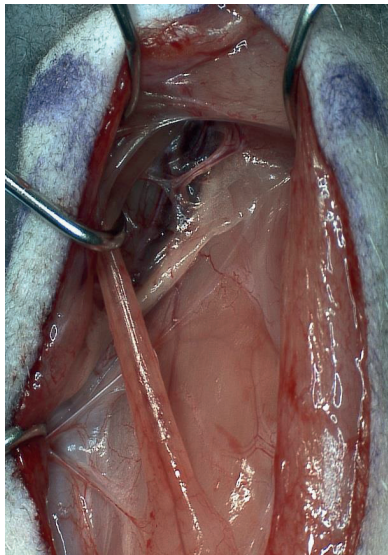
Nach Feststellung einer ausreichenden Dichtigkeit der arteriellen Anastomose wurde die venöse mit der gleichen Vorgehensweise hergestellt. Zehn Minuten später wurde erneut die Durchblutung beider Anastomosen überprüft und dann das Transplantat mittels fortlaufender Unterhautnaht und Haut-Einzelheften (Monocryl 4-0 PS-2, Ethicon, Norderstedt) fertiggestellt. Bei den Tieren der Gruppe 3 wurden anschließend 600 µl EPC-Suspension gleichmäßig an vier Stellen subkutan in das Transplantat injiziert. Zur Verhinderung von Automutilation wurde ein chirurgisches Netz (Prolene, Ethicon, Norderstedt) über die Transplantat-Wunde genäht. Postoperativ erfolgte eine halbstündliche Überprüfung der Vitalparameter bis zum Ende der Aufwachphase. Bis zum Töten wurden die Versuchstiere zweimal täglich klinisch kontrolliert. Die Analgesie wurde in den drei Tagen nach der Operation durch subkutane Injektionen von Buprenorphin fortgesetzt.



A



B

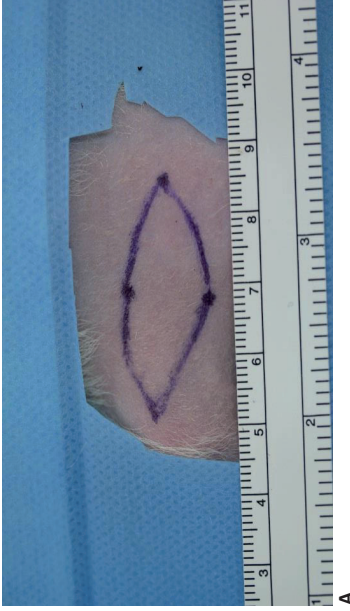


C

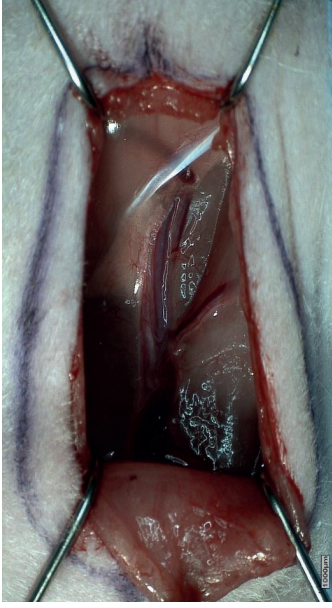


D

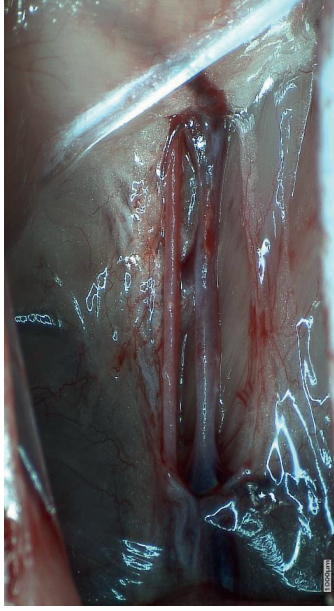
Abbildung 5-1: **A** Übersicht über den Versuchsaufbau vor der Operation. **B** Markierung des Lappentransplantats am Tier mit Zentimetermaß. **C** Übersicht über das OP-Feld. **D** Freigelegte Abgänge der Lappenstielgefäße aus den Axillargefäßen.



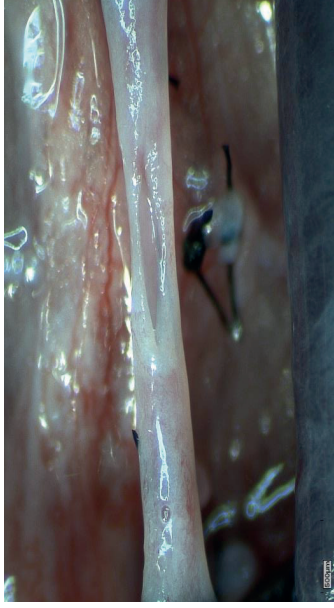
A



B

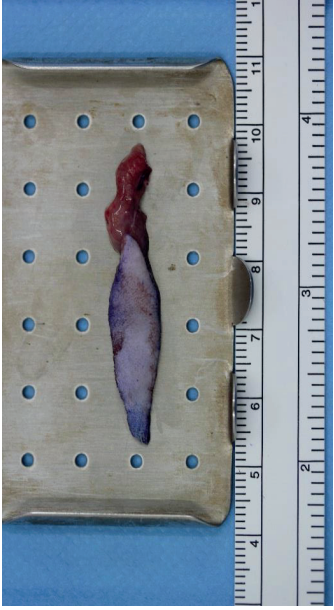


C

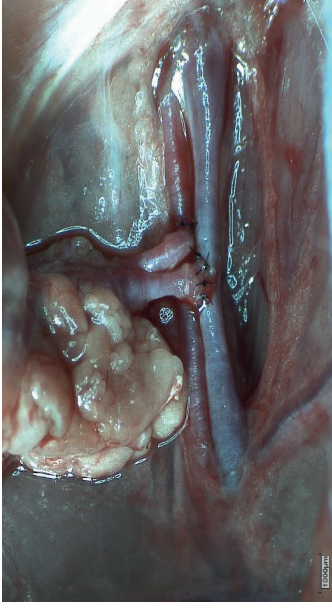


D

Abbildung 5-2: A OP-Feld Leiste mit Zentimeter-Maß. B Übersicht OP-Feld Leiste nach Hautinzision und Mobilisation des inguinalen Fettpolsters. C Freigelegte Empfängergefäße (A. & V. femoralis). D Inzision in A. femoralis vor Anschluss der Empfängergefäße.



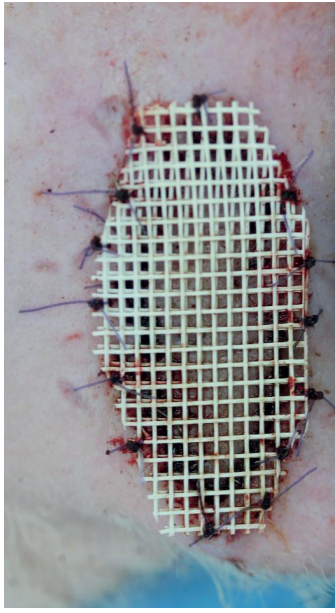
A



B



C



D

Abbildung 5-3: **A** Gehobener Lappen mit Zentimeter-Maß. **B** Anastomosen. **C** Wundverschluss. **D** Netz zum Schutz vor Automutilation.

5.3.6 Histologie

Im Vorversuch erfolgte die Entnahme der Proben für die histologischen Untersuchungen je nach Gruppe an Tag drei, sieben oder zwölf nach Transplantation. Im Hauptversuch erfolgte die Probennahme am siebten Tag nach Transplantation.

In Narkose (100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin intraperitoneal (i.p.)) wurden die Transplantate entnommen. Dabei wurde ein ca. 0,5 cm breiter Rand um das Transplantat mit entfernt. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert (200 mg/kg Pentobarbital i.p.).

Die entnommenen Transplantate wurden in sechs gleich große Gewebestreifen zerteilt (siehe Abbildung 5-4), die in 3,7% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden (Ausgießstation Histocentre 2, Shandon, Frankfurt am Main). Jeweils vom zweiten eingebetteten Gewebestreifen wurden mit einem Mikrotom (Schnittmikrotom Jung SM 2000R, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) 5 µm breite Schnitte angefertigt, die den verschiedenen histologischen Färbungen unterzogen wurden. Eine genaue Beschreibung der Färbungen ist im Anhang zu finden.

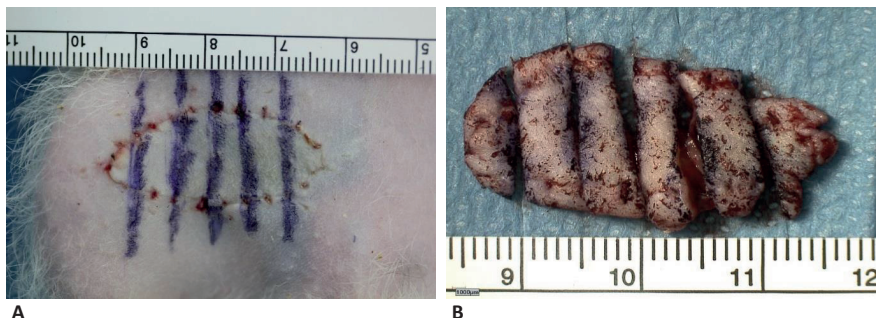


Abbildung 5-4: Übersicht Entnahme Histologie. **A:** Ansicht des Transplantats in der rechten *Regio inguinalis*. Patient in Rückenlage, oberer Bildrand zeigt in kraniale Richtung. **B:** Entnommenes und zerteiltes Präparat.

5.3.6.1 Morphometrische Zellschichtvermessung

Die Schichtdickenmessung der einzelnen Hautschichten erfolgte mikroskopisch an mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparaten. Diese wurden mit einem Fotomikroskop (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen) abfotografiert und mit einem Analyse-Programm (Diskus, Hilgers Technisches Büro, Königswinter) in fünf- oder 20-facher Objektivvergrößerung ausgewertet. Die Schichtdicken (Epidermis, Dermis und Subkutis) wurden an zwei Aufnahmen pro Präparat an jeweils fünf Stellen senkrecht zur Epidermis gemessen und hieraus der Mittelwert gebildet (siehe Abbildung 5-5).

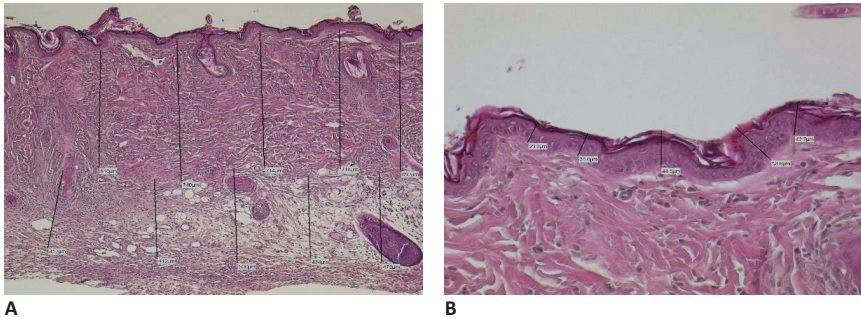


Abbildung 5-5: **A:** Schichtdickenmessung von Subkutis und Kutis am HE-gefärbten Präparat, 5fache Objektivvergrößerung **B:** Gleiches Präparat mit Schichtdickenmessung der Epidermis, 200fache Objektivvergrößerung.

5.3.6.2 Vaskularisation mit Anti-CD31-Färbung

Die Schnitte wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD31 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gefärbt. CD31 ist ein Protein, das sich auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten befindet, weshalb sich die Färbung zur Darstellung von Blutgefäßen eignet. Unter dem Mikroskop stellen sich angefärbte Zellen braun dar.

Nach der Färbung wurden die Schnitte bei zehnfacher Objektivergrößerung in mehreren Einzelaufnahmen vollständig abfotografiert und im Analyse-Programm ausgewertet. Zunächst wurde der Transplantatbereich in jeder Aufnahme markiert und die Fläche bestimmt. Diese Aufnahmen wurden im Anschluss in einem Bildbearbeitungsprogramm (Gimp – GNU Image Manipulation Program) mit einem Raster (165) aus 3100 Quadraten versehen und ausgedruckt.

Zur Bestimmung der Gefäßanzahl pro Quadratmillimeter wurde in allen Aufnahmen eines Präparats die Gefäße ausgezählt und die Summe durch die Gesamtfläche des Präparats geteilt. Als Gefäß wurden die braungefärbten Strukturen im Präparat einzeln gezählt.

Zur Bestimmung der prozentualen Gefäßoberfläche (*Microvessel Area, MVA*) wurde die Gesamtfläche der Gefäße in mm^2 bestimmt und diese ins Verhältnis zur Präparatgröße in mm^2 gesetzt. Die Gesamtfläche der Gefäße wurde folgendermaßen bestimmt: An den mit Raster ausgedruckten Aufnahmen wurden die positiven Ereignisse ausgezählt. Als positives Ereignis zählte die charakteristische braune Farbreaktion in einem Raster-Quadrat, welches dann in der linken oberen Ecke mit einem farbigen Punkt versehen wurde. Die Anzahl der positiven Ereignisse wurde mit der Fläche eines einzelnen Raster-Quadrats in mm^2 multipliziert (siehe Abbildung 5-6).

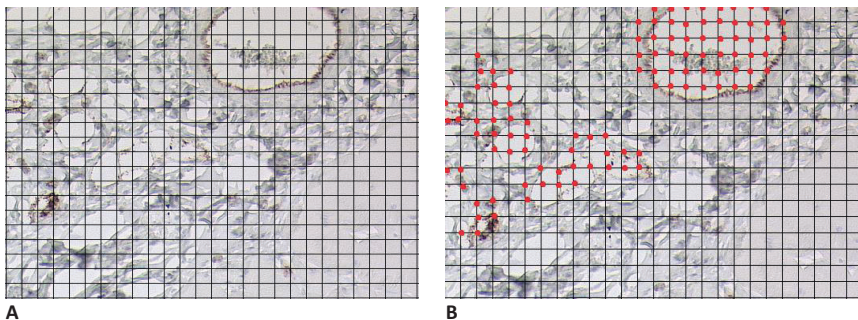


Abbildung 5-6: **A:** Ausschnitt eines mit CD31 gefärbten histologischen Präparats mit eingefügtem Raster, 10fache Objektivergrößerung. **B:** Gleiches Präparat mit Markierung der Gefäßflächen.

5.3.6.3 Proliferationsrate

Die Präparate wurden mit Antikörpern gegen das *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) gefärbt, um proliferierende Zellen darzustellen.

PCNA ist ein Protein, das während der S-Phase der Zellteilung im Zellkern exprimiert wird und als Kofaktor der Desoxyribonukleinsäure-(DNA)Polymerase dient, indem es deren Bindung an die DNA stabilisiert (166).

Von den gefärbten Schnitten wurden jeweils vier repräsentative Aufnahmen bei 40-facher Objektivvergrößerung angefertigt und ausgewertet. An den ausgedruckten Aufnahmen wurden die positiven Farbreaktionen ausgezählt, der Mittelwert gebildet und als Anzahl pro Gesichtsfeld angegeben (siehe Abbildung 5-7).

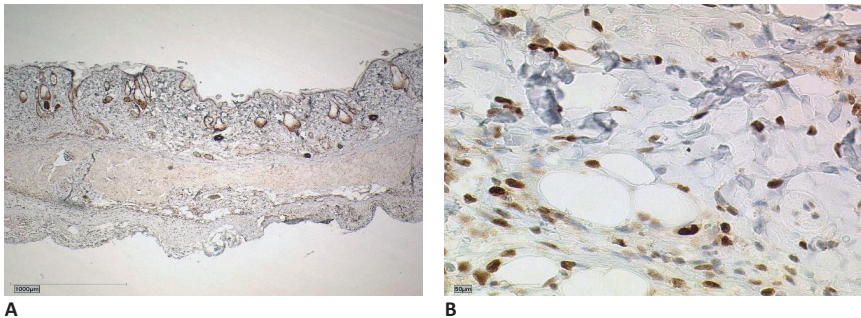


Abbildung 5-7: **A:** Ausschnitt eines mit anti-PCNA gefärbten histologischen Präparats, 2,5fache Objektivvergrößerung. **B:** Gleiches Präparat bei 40facher Objektivvergrößerung. Zu sehen sind die braun angefärbten Zellkerne der proliferierenden Zellen.

5.3.7 Perfusion

Am Tag sieben nach der Transplantation erfolgte die Anfertigung von Gefäßausgüssen (*corrosion casts*) der Transplantate (im Nachfolgenden „Perfusion“ genannt) in Narkose (100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin i.p.).

Nach Erreichen einer genügenden Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage unter einem Stereomikroskop fixiert. Nun erfolgte eine Laparotomie in der *Linea alba* und *Aorta abdominalis* und *V. cava caudalis* wurden dargestellt. Beide wurden vom Abgang der *A. und V. renalis* bis zur Aufzweigung in die *Arteriae (Aa.)* bzw. *Venae (Vv.) iliacae communes* stumpf frei präpariert.

Nun wurde die Aorta direkt kaudal der *A. renalis* ligiert und weiter kaudal eine zweite Ligatur auf halber Höhe der Aorta vorgelegt. Nun erfolgte im Bereich der zweiten Ligatur eine Aortotomie, über die eine Knopfkanüle in Blutflussrichtung eingeführt und mit der zweiten Ligatur fixiert wurde. Nun wurde die *V. cava* eröffnet und die Aorta über die Knopfkanüle mit 40 ml isotoner Kochsalzlösung (NaCl) gespült. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Kunstharz (Resin PU4ii, VasQtec, Zürich) und die abschließende Euthanasie der Tiere (200 mg/kg Pentobarbital intrathorakal). Nach einer Aushärtungszeit von mindestens einer Stunde wurden die Gewebeproben entnommen.

Die Proben wurden 24 Stunden in Wasser und danach 72 Stunden in Kaliumhydroxid-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) eingelegt. Die zurückbleibenden Abbilder der Gefäße (nachfolgend Präparate genannt) wurden auf einem Probenteller (Baltic-Präparation, Niesgrau, Deutschland) fixiert und erhielten einen gleichmäßigen Überzug aus Gold und Palladium für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop.

5.3.8 Vermessung der dreidimensionalen Gefäßarchitektur

Von jedem Präparat wurden acht Bildpaare bei 200- bis 250-facher Objektvergrößerung unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) (Philips ESEM XL-30, Philips Nederland B.V., Eindhoven) aufgenommen.

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers in μm wurden jeweils die erste Aufnahme der acht Bildpaare ausgewertet. Im Computer-Programm Scandium Imaging (EMSIS GmbH, Münster) wurden jeweils 40 Gefäßdurchmesser ausgemessen. Hierfür wurde Orthogonale zur Längsachse des Gefäßes gelegt und deren Länge in μm bestimmt.

Die nachfolgenden Parameter wurden an den acht Bildpaaren mit dem Programm Carl Zeiss Vision KS 300 3.0 (Carl Zeiss International GmbH, Aalen) ausgewertet, wobei zuerst die Winkelung der Bildpaare durch dreidimensionale Überlagerung überprüft wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem von Malkusch et al. beschriebenen Analyseverfahren (167), bei dem mit Hilfe der Parallaxe die Tiefe der einzelnen Bildpunkte bestimmt wird.

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Winkels der Gefäßaufzweigungen in Grad (*branching angle*, BRA) wurden an jedem Bildpaar 20 Gefäßaufzweigungen ausgewählt und die Winkel vermessen. Hierfür wurde ein Punkt in der Mitte des Ursprungsgefäßes und jeweils ein Punkt in der Mitte der Tochtergefäße gesetzt. Diese wurden zu einem in Richtung der Tochtergefäße offenem Dreieck verbunden und der innenliegende Winkel bestimmt.

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßabstands in μm (*intervascular distance*, IVD) wurden an jedem Bildpaar 40 Gefäßabstände vermessen. Hierfür wurde jeweils die Strecke von der Gefäßmitte bis zur Mitte des nächstbenachbarten Gefäßes gemessen.

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Abstands der Gefäßaufzweigungen in μm (*interbranching distance*, IBD) wurden an jedem Bildpaar 20 Gefäßaufzweigungen ausgewählt und die Strecke zur nächsten benachbarten Aufzweigung gemessen. Der Start- und Endpunkt der Strecke lag jeweils in der Gefäßmitte auf Höhe der Aufzweigungen.

Zur Auszählung der *pillars* und *sprouts* wurden jeweils fünf Bildausschnitte bei höherer Vergrößerung aus repräsentativen Bereichen des Präparates ausgewählt und die Anzahl bestimmt.

Beispielhaft sind die Auszählungen in Abbildung 5-8 dargestellt.

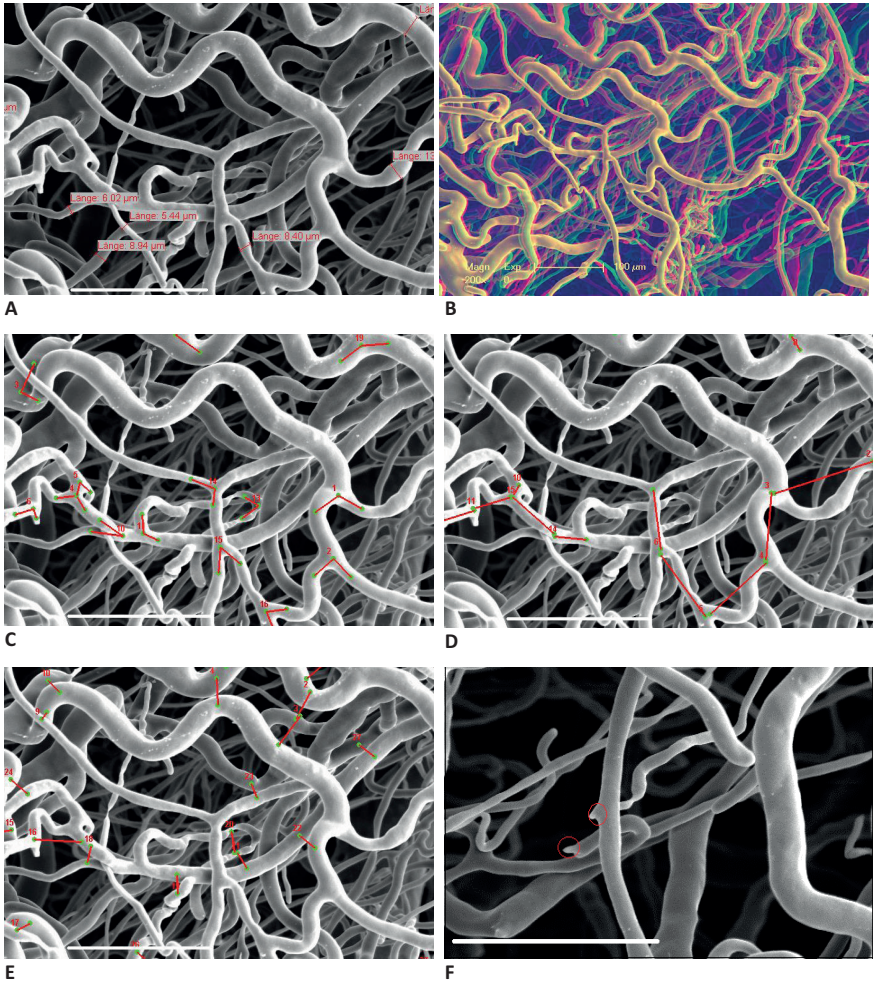


Abbildung 5-8: Beispiele der 3D-Messungen. Der weiße Balken am unteren Bildrand hat eine Länge von 100 µm. Die roten Messungen stellen die gemessenen Strecken dar, die grünen Punkte Anfang und Ende der jeweiligen Messstrecke. **A:** Gefäßdurchmesser. **B:** Dreidimensionale Überlagerung der Bildpaare. **C:** Winkel der Gefäßaufzweigungen. **D:** Abstand der Gefäßaufzweigungen. **E:** Abstand der Gefäße zueinander. **F:** Auszählung von *sprouts*.

5.4 Statistische Auswertung

5.4.1 Vorversuch

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk des Instituts für funktionelle und klinische Anatomie des Fachbereichs Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogramms Sigma Plot mit Sigma Stat-Erweiterung (Systat Software GmbH, Erkrath) durchgeführt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, Minima und Maxima und Stichprobenumfänge berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf die Signifikanz wurde ein Mann-Whitney Rank-Sum-Test durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

5.4.2 Hauptversuch

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1 (168) durchgeführt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima und Stichprobenumfänge berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Um zu überprüfen, ob die Merkmale über die Gruppen hinweg normalverteilt waren, wurden die Residuen berechnet und mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsplots auf Normalverteilung überprüft.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Lokalisationseinflusses auf die Signifikanz wurde eine ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

6 Ergebnisse

6.1 Etablierung Operation und Perfusion

Neun von 14 Anastomosen der Femoralgefäße erwiesen sich 24 Stunden nach Durchführung als durchgängig; dies entspricht einer Komplikationsrate von 33 %. Ein Tier erlitt einen Narkosezwischenfall und konnte nicht erfolgreich reanimiert werden. In Abbildung 6-1 lässt sich ein deutlicher Lernprozess nachvollziehen.

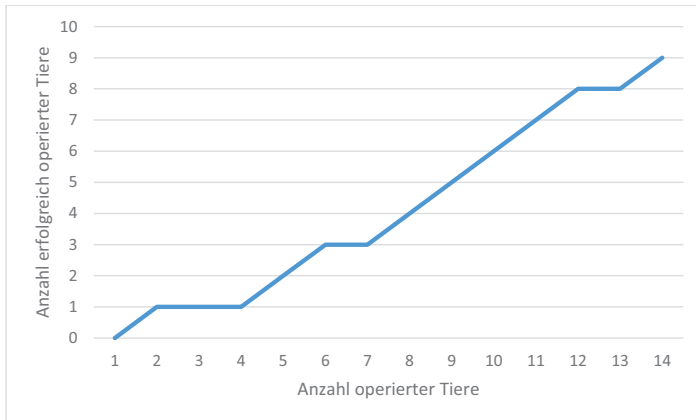


Abbildung 6-1: Lernkurve, dargestellt anhand der erfolgreich operierten Tiere im Verhältnis zur Gesamtzahl der operierten Tiere

Im Rahmen der Etablierung der Operationsmethode konnten Änderungen vorgenommen werden, die zu einer Verbesserung des Tierwohls führten. Der Erhalt des *M. pectoralis maior* verhinderte das Auftreten von Funktionseinbußen der rechten Vordergliedmaße und verringerte die postoperativen Schmerzen.

Der Erhalt der Axillargefäße verringerte die Verletzung der Spenderregion, die auch als Hebemorbidity bezeichnet wird. Gleichzeitig erschwerte er die Anastomosierung, da der Gefäßdurchmesser des Lappenstiels geringer war.

Der Einsatz von End-zu-Seit- anstatt von End-zu-End-Anastomosen zeigte ebenfalls positive Effekte. Die Zahl der erfolgreichen Anastomosen und damit erfolgreicher Lappen-Transfers stieg deutlich. Weiterhin konnte durch den Erhalt des Blutflusses in den Femoralgefäßen die Morbidity im Empfängergebiet deutlich gesenkt werden.

Bei der Etablierung der Perfusionen zeigte sich, dass die bei Mäusen übliche Methode der Perfusion über das Herz nicht möglich war. Aufgrund der größeren Masse der Ratte und des damit verbundene höheren Blutvolumens und Gefäßwiderstands musste das zu perfundierende Körperareal verkleinert

werden. Nach mehreren Versuchen erwies sich die Perfusion über die *Aorta abdominalis* als geeignete Methode.

6.2 Vorversuch

6.2.1 Tieranzahl

Von den 37 verwendeten Tieren gingen 24 in die Auswertung ein und elf Tiere konnten nicht verwendet werden; dies entspricht einer gesamten Komplikationsrate von 31 %. Von diesen elf Tieren erlitten fünf einen Narkosezwischenfall, fünf ein Transplantatversagen und ein Tier konnte nicht erfolgreich perfundiert werden.

6.2.2 Histologie

6.2.2.1 Gefäßanzahl pro mm²

Die Lappentransplantate wiesen zu allen drei Entnahmezeiten eine höhere Gefäßdichte auf als die zur Kontrolle entnommenen Proben. Die Unterschiede waren in Gruppe 2 und 3 signifikant.

Ebenso nahm die Gefäßdichte im Lappentransplantat mit der Zeit nach Operation zu. Zwischen Gruppe 1 und 3, sowie zwischen Gruppe 2 und 3 waren diese Unterschiede signifikant (siehe Tabelle 6-1 und Abbildung 6-2 sowie 6-4).

Gefäßanzahl pro mm ²			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT3	55,45	11,62	MT12
K3	51,39	10,03	
MT7	64,3	19,17	K7, MT12
K7	38,16	8,65	MT7
MT12	78,57	32,81	K12, MT3, MT7
K12	34,52	10,00	MT12

Tabelle 6-1: Vergleich der Gefäßanzahl pro mm² zwischen den Gruppen. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle. 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

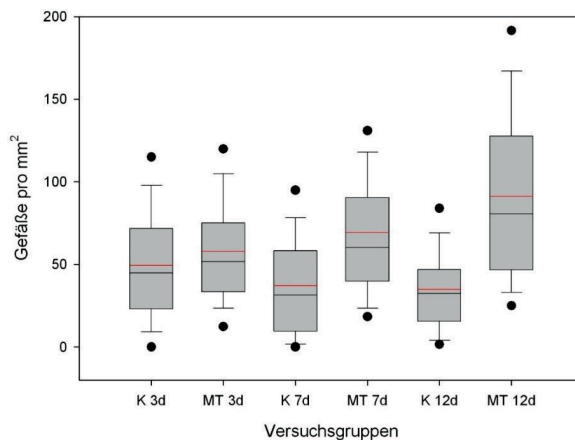


Abbildung 6-2: Grafische Darstellung der Verteilung der Gefäßanzahl pro mm² als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.2.2 Microvessel Area

Innerhalb der Gruppen wiesen die Lappentransplantate eine signifikant höhere Microvessel Area als die Kontrollen auf. Zwischen den Gruppen war die MVA zwischen Gruppe 1 und 2 sowie zwischen 1 und 3 signifikant erhöht. Zwischen Gruppe 2 und 3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 6-2 und Abbildung 6-3).

MVA in Prozent			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT3	4,93	1,24	K3, MT7, MT12
K3	3,52	1,00	MT3
MT7	6,61	0,91	K7, MT3
K7	3,18	1,06	MT7
MT12	5,76	1,29	K12, MT3
K12	2,61	0,67	MT12

Tabelle 6-2: Vergleich der MVA in Prozent zwischen den Gruppen. MVA = Microvessel Area, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle. 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

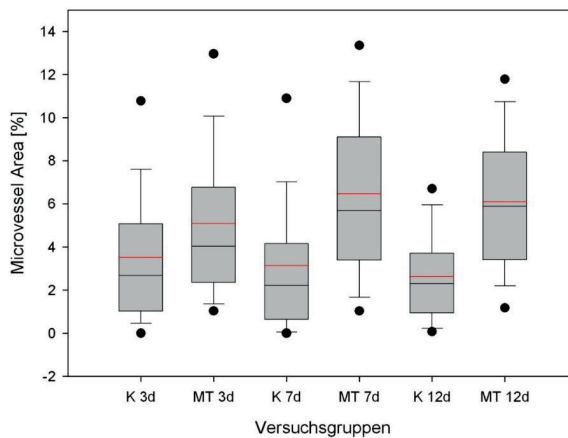


Abbildung 6-3: Grafische Darstellung der Verteilung von MVA in Prozent als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. MVA = Microvessel Area, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

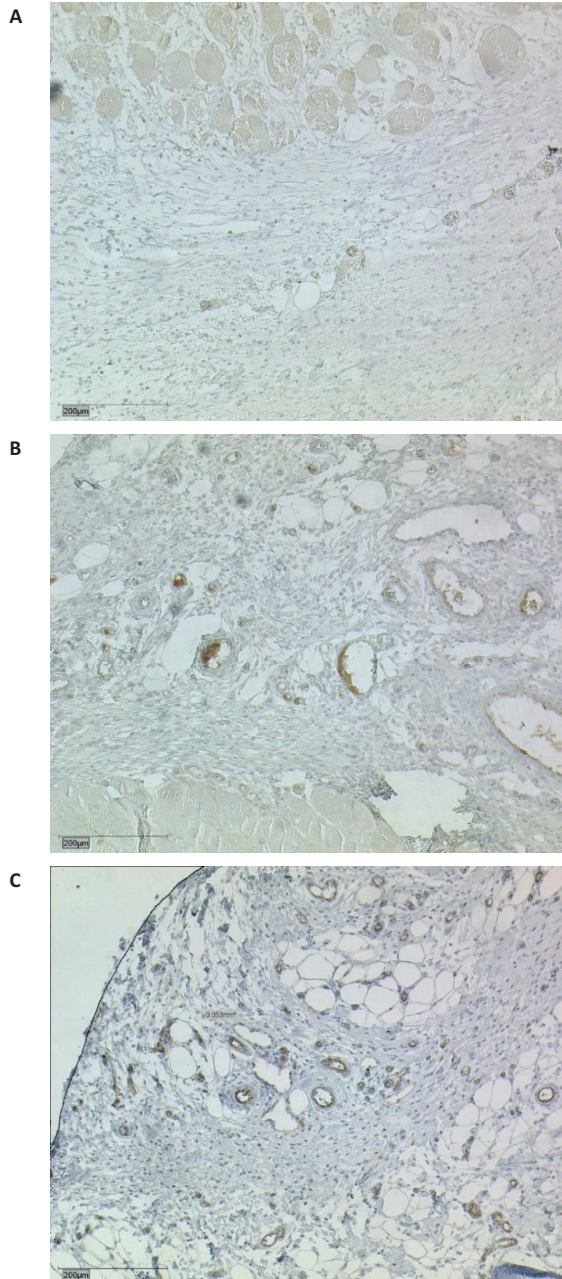


Abbildung 6-4: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der histologischen Präparate mit CD 31 Färbung, 10fache Objektivvergrößerung. Eine Zunahme der Gefäßdichte ist von oben nach unten erkennbar. **A:** MT 3. **B:** MT 7. **C:** MT 12. MT = Mikrovaskuläres Transplantat. 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.3 Perfusion

Die Auswertung von Gruppe 1 war nicht möglich, da die Anastomosen drei Tage nach Operation noch zu fragil waren. Sie hielten dem Druck der Perfusion größtenteils nicht stand, sodass das Kunstharz an der Anastomose-Stelle austrat und die distal liegenden Gefäßabschnitte nicht perfundiert wurden. Zu den späteren Entnahmezeitpunkten hielt die Anastomose, weshalb Gruppe 2 und 3 in die Auswertung eingingen.

6.2.3.1 Gefäßdurchmesser

Innerhalb der Gruppen wiesen die Lappentransplantate einen signifikant höheren Gefäßdurchmesser als die Kontrollen auf.

Gruppe 2 zeigte einen signifikant höheren Gefäßdurchmesser als Gruppe 3 (siehe Tabelle 6-3 und Abbildung 6-5).

Gefäßdurchmesser in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	13,28	8,41	K7, MT12
K7	8,05	4,69	MT7
MT12	11,56	8,92	K12, MT7
K12	9,85	6,58	MT12

Tabelle 6-3: Vergleich des Gefäßdurchmessers in μm zwischen den Gruppen. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

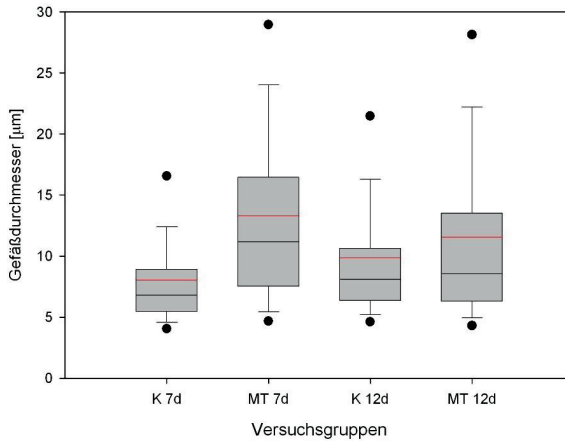


Abbildung 6-5: Grafische Darstellung der Verteilung des Gefäßdurchmessers in μm als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.3.2 Gefäßabstand

Innerhalb der Gruppen wiesen die Lappentransplantate einen signifikant höheren Gefäßabstand als die Kontrollen auf.

Gruppe 2 zeigte einen signifikant höheren Gefäßabstand als Gruppe 3 (siehe Tabelle 6-4 und Abbildung 6-6).

IVD in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	26,16	14,07	K7, MT12
K7	17,76	10,83	MT7
MT12	22,01	13,37	K12, MT7
K12	19,21	10,81	MT12

Tabelle 6-4: Vergleich der IVD in μm zwischen den Gruppen. IVD = *Intervascular distance*, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

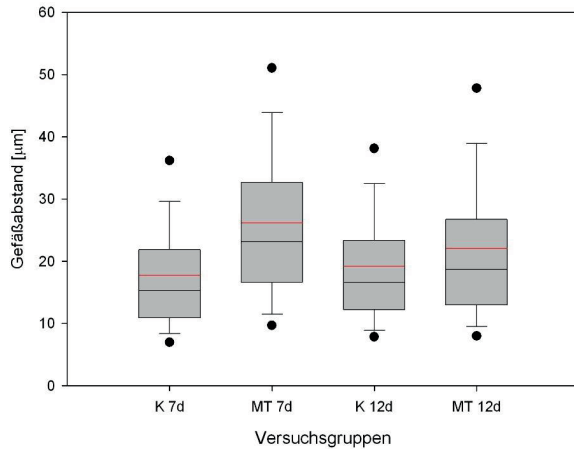


Abbildung 6-6: Grafische Darstellung der Verteilung der IVD als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. IVD = *intervascular distance*, MT=Mikrovaskuläres Transplantat, K=Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.3.3 Abstand der Gefäßaufzweigungen

In Gruppe 2 wiesen die Lappentransplantate einen signifikant höheren Abstand der Gefäßaufzweigungen als die Kontrollen auf. In Gruppe 3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Zwischen Gruppe 2 und 3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 6-5 und Abbildung 6-7).

IBD in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	40,05	30,82	K7
K7	34,22	28,50	MT7
MT12	39,81	33,38	
K12	34,76	28,84	

Tabelle 6-5: Vergleich der IBD in μm zwischen den Gruppen. IBD = *interbranching distance*, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

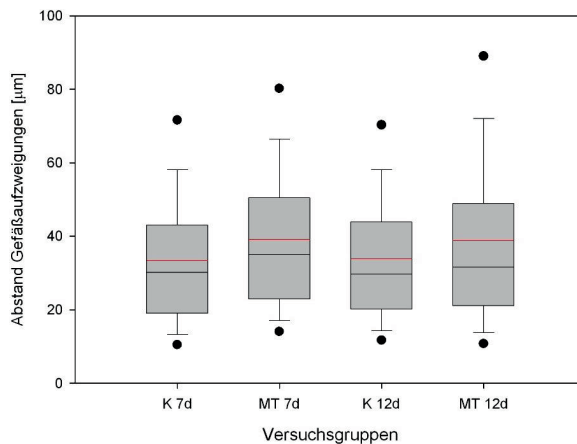


Abbildung 6-7: Grafische Darstellung der Verteilung der IBD in μm als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. IBD = *interbranching distance*, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.3.4 Winkel der Gefäßaufzweigungen

Weder innerhalb noch zwischen den Gruppen konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Aufzweigungswinkels der Gefäße festgestellt werden (siehe Tabelle 6-6 und Abbildung 6-8).

BRA in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	76,94	26,54	-
K7	75,83	27,36	-
MT12	77,88	25,52	-
K12	77,05	27,47	-

Tabelle 6-6: Vergleich der BRA in μm zwischen den Gruppen. BRA = *branching angle*, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

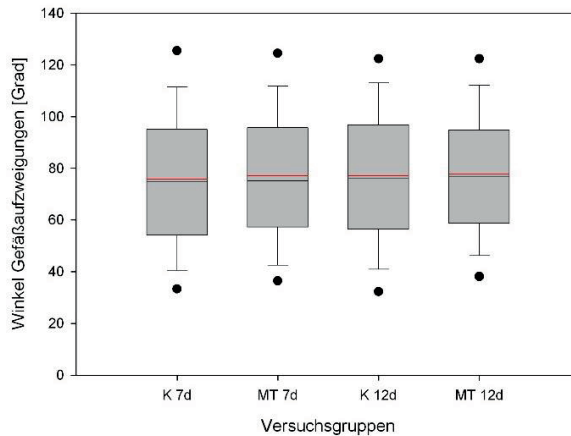


Abbildung 6-8: Grafische Darstellung der Verteilung des BRA in Grad als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. BRA = *branching angle*, MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.2.3.5 Pillars und Sprouts

Weder innerhalb noch zwischen den Gruppen konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl von *pillars* und *sprouts* festgestellt werden (siehe Tabelle 6-7, 6-8 sowie Abbildung 6-9).

Anzahl der <i>pillars</i>			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	0,5	0,76	-
K7	0,15	0,36	-
MT12	0,4	1,18	-
K12	0,7	1,41	-

Tabelle 6-7: Vergleich der Anzahl der *Pillars* zwischen den Gruppen. MT=Mikrovaskuläres Transplantat, K=Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

Anzahl der <i>pillars</i>			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
MT7	7,75	7,47	-
K7	6,65	3,86	-
MT12	6,9	5,32	-
K12	8,75	6,91	-

Tabelle 6-8: Vergleich der Anzahl der *Sprouts* zwischen den Gruppen. MT=Mikrovaskuläres Transplantat, K=Kontrolle, 7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

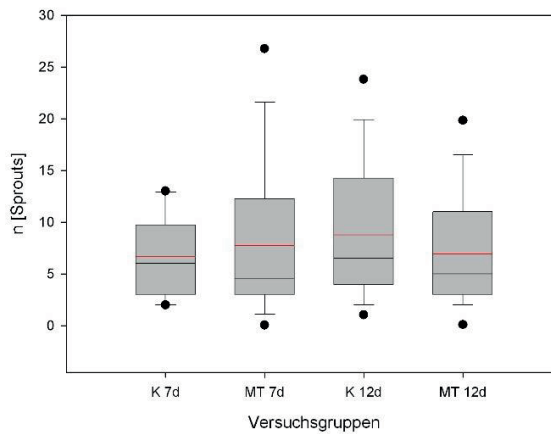
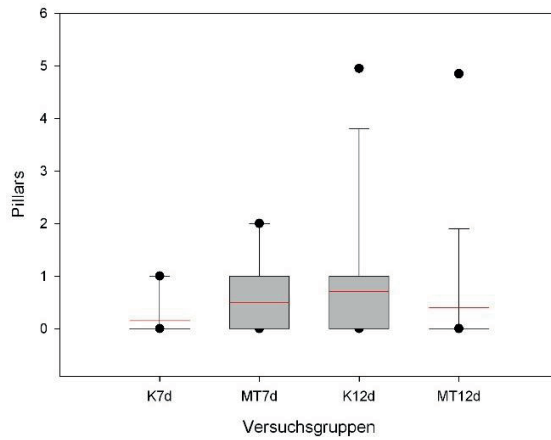


Abbildung 6-9: Grafische Darstellung der Verteilung der Anzahl von *pillars* und *sprouts* als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

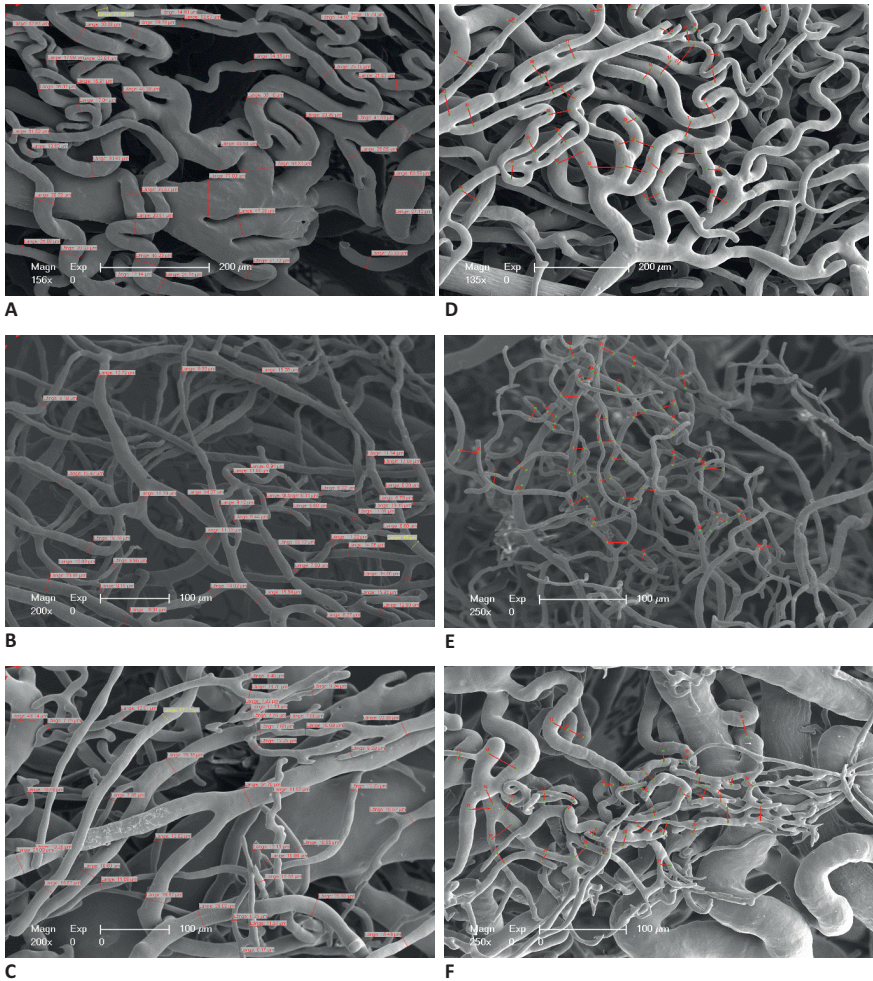


Abbildung 6-10: Rasterelektronische Aufnahmen der *corrosion casts*. Die roten Messungen stellen die gemessenen Strecken dar, die grünen Punkte Anfang und Ende der jeweiligen Messstrecke. Bilder A-C zeigen beispielhaft die Messung der Gefäßdurchmesser und den erhöhten Durchmesser in Gruppe MT7. D-E zeigen die Messung der intervascular distance und den erhöhten Abstand in Gruppe MT7. A: MT7. B: MT7. C: MT12 D: MT7. E: K7. F: MT12. MT = Mikrovaskuläres Transplantat, K = Kontrolle, 3,7,12 = Entnahmezeitpunkt in Tagen nach Operation

6.3 Hauptversuch

6.3.1 Tieranzahl

Von den 60 verwendeten Tieren gingen 36 in die Auswertung ein und 24 Tiere konnten nicht verwendet werden; dies entspricht einer gesamten Komplikationsrate von 40 %. Von diesen 24 Tieren erlitten 8 einen Narkosezwischenfall, 14 ein Transplantatversagen und zwei Tiere konnten nicht erfolgreich perfundiert werden.

6.3.2 Histologie

6.3.2.1 Gefäße pro mm²

Die Behandlungsgruppen wiesen eine signifikant höhere Gefäßdichte auf als die Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 6-9 und Abbildung 6-11).

Gefäße pro mm ²			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	96,12	18,99	2,3
2	133,68	29,99	1
3	140,06	40,04	1

Tabelle 6-9: Vergleich der Gefäßanzahl pro mm² zwischen den Gruppen. 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

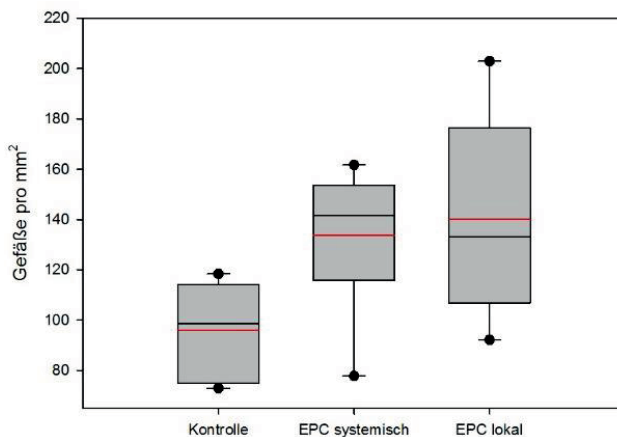


Abbildung 6-11: Vergleich der Gefäßanzahl pro mm² zwischen den Gruppen. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. Kontrolle = Gruppe 1, EPC systemisch = Gruppe 2, EPC lokal = Gruppe 3

6.3.2.2 Microvessel Area

Die Behandlungsgruppen wiesen eine signifikant höhere MVA auf als die Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 6-10 und Abbildung 6-12).

MVA in Prozent			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	25,82	3,84	2,3
2	35,34	5,45	1
3	35,26	9,34	1

Tabelle 6-10: Vergleich der MVA in Prozent zwischen den Gruppen. MVA = *Microvessel area*, 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

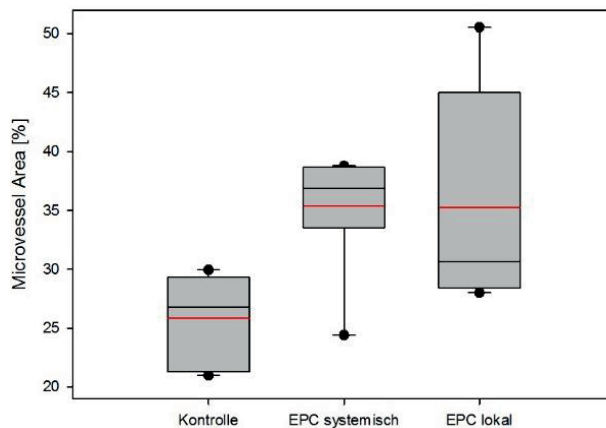


Abbildung 6-12: Vergleich der MVA in Prozent zwischen den Gruppen. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. MVA = *Microvessel area*, Kontrolle = Gruppe 1, EPC systemisch = Gruppe 2, EPC lokal = Gruppe 3

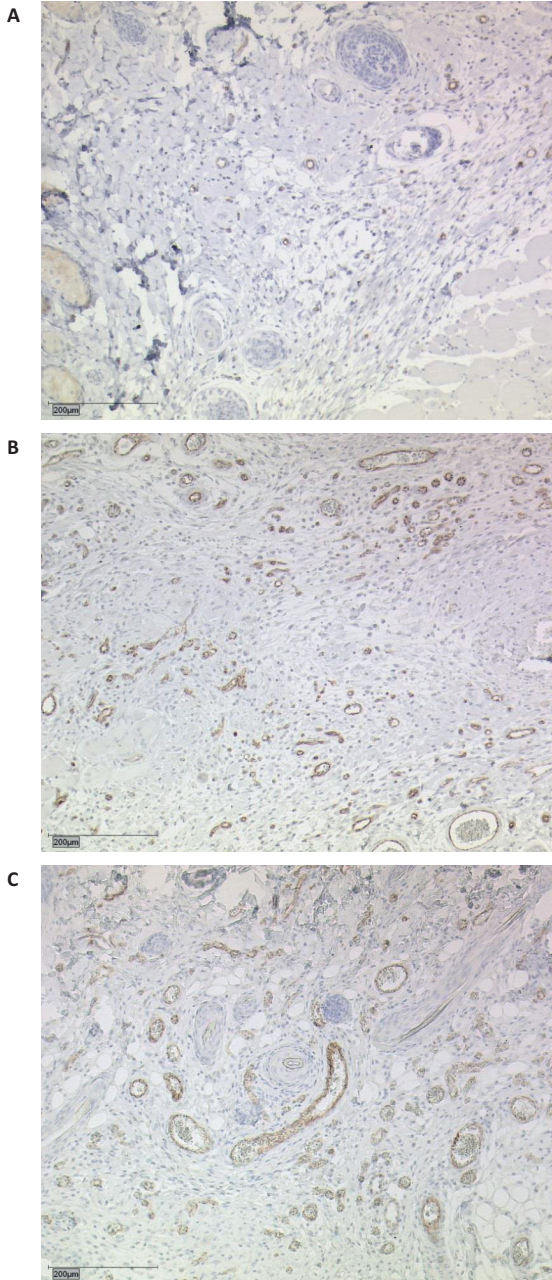


Abbildung 6-13: Repräsentative Aufnahmen der Präparate mit CD 31 Färbung, 10fache Objektivvergrößerung. Eine Zunahme der Gefäßdichte (braun angefärbt) in Gruppe 2 (Bild **B**) und 3 (Bild **C**) gegenüber Gruppe 1 (Bild **A**) ist erkennbar. Gruppe 1 = Kontrolle, Gruppe 2 = EPC intraarterielle, Gruppe 3 = EPC subkutan

6.3.2.3 Proliferationsrate

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proliferationsraten festgestellt werden (siehe Tabelle 6-11 und Abbildung 6-14).

Proliferationsrate			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	96,83	23,36	-
2	92,83	19,09	-
3	84,66	11,67	-

Tabelle 6-11: Vergleich der Proliferationsrate pro Gesichtsfeld zwischen den Gruppen. 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

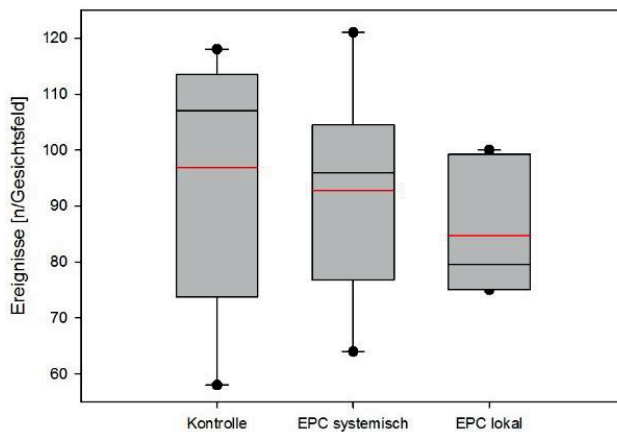


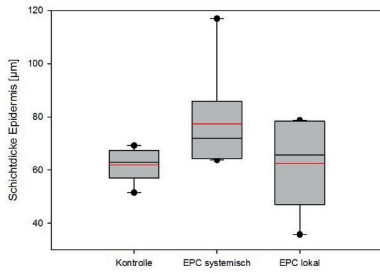
Abbildung 6-14: Vergleich der Proliferationsraten in Ereignissen pro Gesichtsfeld zwischen den Gruppen. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. Kontrolle = Gruppe 1, EPC systemisch = Gruppe 2, EPC lokal = Gruppe 3

6.3.2.4 Schichtdickenvermessung

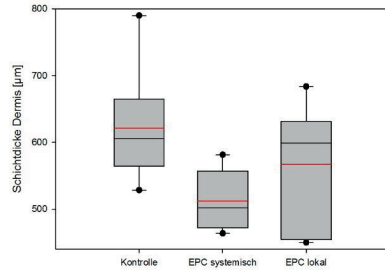
Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Dicke der einzelnen Schichten oder der gesamten Schichtdicke festgestellt werden (siehe Tabelle 6-12 und Abbildung 6-15).

Schichtdicke in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1 Ep	61,98	6,05	-
2 Ep	62,45	15,32	-
3 Ep	77,42	18,20	-
1 De	621,56	89,27	-
2 De	512,01	47,48	-
3 De	566,73	93,75	-
1 Su	398,15	104,98	-
2 Su	304,51	24,93	-
3 Su	340,11	76,27	-
1 Ge	1081,70	173,09	-
2 Ge	893,95	58,81	-
3 Ge	969,30	160,42	-

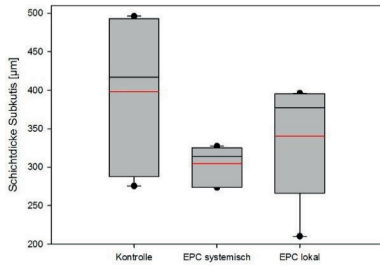
Tabelle 6-12: Vergleich der Schichtdicke in μm zwischen den Gruppen 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c. Ep= Epidermis, De=Dermis, Su=Subkutis, Ge=Gesamtdicke aller drei Schichten



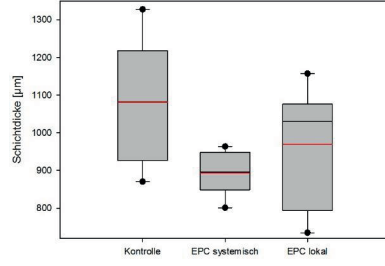
A



B



C



D

Abbildung 6-15: Grafische Darstellung der Histologischen Ergebnisse als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar. Schichtdickenmessung von **A** Epidermis, **B** Dermis, **C** Subkutis und **D** gesamter Hautdicke. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

6.3.3 Perfusion

6.3.3.1 Gefäßdurchmesser

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gefäßdurchmessers festgestellt werden (siehe Tabelle 6-13 und Abbildung 6-16).

Gefäßdurchmesser in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	10,98	1,33	-
2	10,83	2,07	-
3	8,99	0,92	-

Tabelle 6-13: Vergleich des Gefäßdurchmessers in μm zwischen den Gruppen. 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

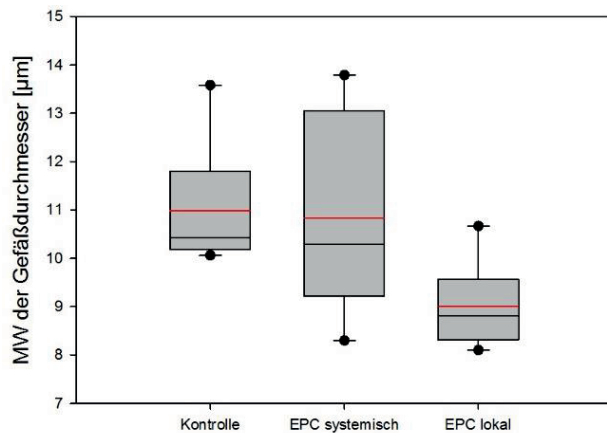


Abbildung 6-16: Grafische Darstellung des Gefäßdurchmessers in μm als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

6.3.3.2 Gefäßabstand

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Abstands der Gefäße zueinander festgestellt werden (siehe Tabelle 6-14 und Abbildung 6-17).

IVD in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	19,78	1,79	-
2	19,02	2,76	-
3	18,43	1,57	-

Tabelle 6-14: Vergleich der IVD in μm zwischen den Gruppen. IVD = *intervascular distance*, 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

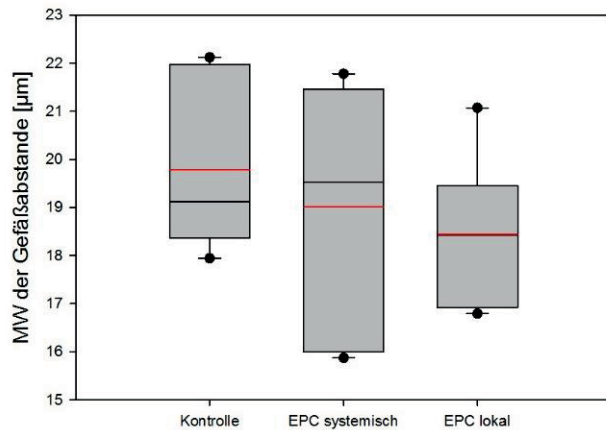


Abbildung 6-17: Grafische Darstellung der IVD in μm als Box-and-Whiskers-Plot. IVD = *intervascular distance*. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

6.3.3.3 Abstand der Gefäßaufzweigungen

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Abstands der Gefäßaufzweigungen zueinander festgestellt werden (siehe Tabelle 6-15 und Abbildung 6-18).

IBD in μm			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	35,52	4,72	-
2	34,56	1,37	-
3	32,23	2,45	-

Tabelle 6-15: Vergleich der IBD in μm zwischen den Gruppen. IBD = *interbranching distance*, 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

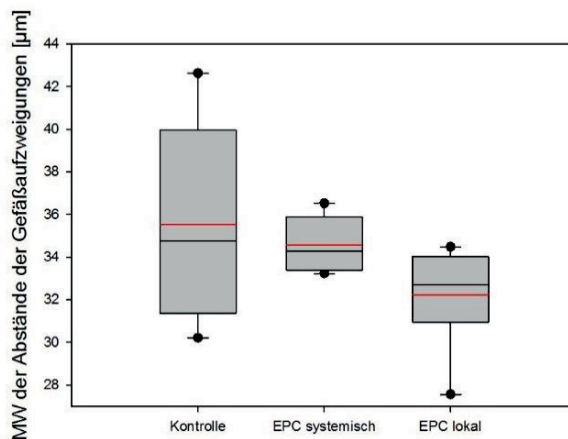


Abbildung 6-18: Grafische Darstellung der IBD in μm als Box-and-Whiskers-Plot. IBD = *interbranching distance*. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

6.3.3.4 Winkel der Gefäßaufzweigungen

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Winkels der Gefäßaufzweigungen festgestellt werden (siehe Tabelle 6-16 und Abbildung 6-19).

BRA in Grad			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	77,60	2,76	-
2	75,10	3,41	-
3	77,01	2,19	-

Tabelle 6-16: Vergleich des BRA in Grad zwischen den Gruppen. BRA = *branching angle*, 1=Kontrolle, 2=EPC i.a., 3=EPC s.c.

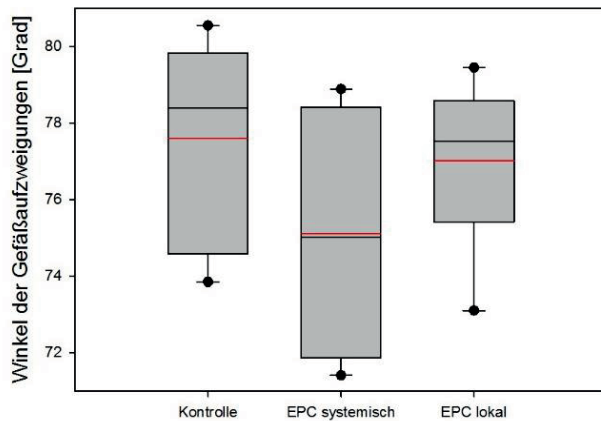


Abbildung 6-19: Grafische Darstellung des BRA in Grad als Box-and-Whiskers-Plot. BRA = *branching angle*. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

6.3.3.5 Pillars und Sprouts

Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl an *pillars* und *sprouts* festgestellt werden (siehe Tabelle 6-17 und 6-18 sowie Abbildung 6-20).

Anzahl der <i>pillars</i>			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	6,16	5,07	-
2	4,16	4,26	-
3	4,5	4,76	-

Tabelle 6-17: Vergleich der Anzahl der *pillars* zwischen den Gruppen. 1=Kontrolle, 2=ECP i.a., 3=EPC s.c.

Anzahl der <i>sprouts</i>			
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikante Unterschiede zu
1	1,58	0,22	-
2	1,5	0,15	-
3	1,6	0,13	-

Tabelle 6-18: Vergleich der Anzahl der *sprouts* zwischen den Gruppen. 1=Kontrolle, 2=ECP i.a., 3=EPC s.c.

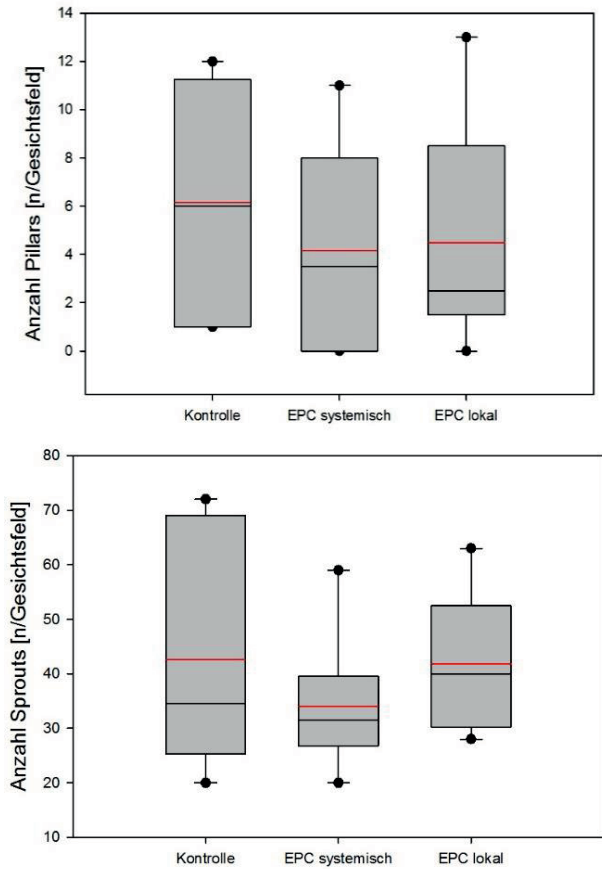


Abbildung 6-20: Grafische Darstellung der Anzahl der *sprouts* und *pillars* pro Gesichtsfeld als Box-and-Whiskers-Plot. Schwarz dargestellt ist der Median, rot der arithmetische Mittelwert. Die Grenzen der Boxen stellen die 25%- und 75%-Perzentile dar.

7 Diskussion

Der chirurgische Wundverschluss gehört zu den täglichen Aufgaben in der human- und tiermedizinischen Praxis. Je nach Art der Wunde stehen dem Chirurgen verschiedene Möglichkeiten zur Defektdeckung zur Verfügung, deren Komplexität anhand der „rekonstruktiven Leiter“ steigt (169). Freie Lappentransplantate haben sich in der Humanmedizin für viele Indikationen der plastischen Chirurgie durchgesetzt, stellen jedoch die größten Ansprüche an die präoperative Planung, die chirurgische Technik und postoperative Überwachung (69). Aus diesen Gründen kommen sie in der Veterinärmedizin selten zum Einsatz.

Da eine erfolgreiche Transplantation eng mit der Blutversorgung des verpflanzten Gewebes einhergeht, ist diese ein vielversprechender Ansatzpunkt für weitere wissenschaftliche Untersuchungen. Eine Verbesserung der Vaskularisation kann die Komplikationsrate senken und für eine sicherere Anwendung von freien Lappentransplantaten sorgen.

7.1 Ergebnisbezogener Abschnitt

7.1.1 Etablierung der Methoden

Zur erfolgreichen Durchführung von freien Lappentransplantaten ist zunächst das Erlernen von mikrochirurgischen Techniken notwendig. Die im Vorversuch gezeigte Lernkurve an mikrovaskulären Anastomosen im Tiermodell ist vergleichbar mit den Fortschritten, die in anderen Studien berichtet werden (170). Wie dort dargestellt, zeigte sich auch in dieser Studie, dass Übungen an nicht-tierischen Modellen die Lernkurve positiv beeinflussen und jeder Übung am lebenden Tier vorausgehen sollten. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass die erfolgreiche Durchführung eines freien Lappentransplantats noch weitere Voraussetzungen erfordert. Die in der vorliegenden Studie gezeigte Erfolgsrate liegt unter denen anderer Studien (162, 171).

Die schlechteren Ergebnisse lassen sich durch verschiedene Faktoren erklären, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

Viele Studien mit Tiermodellen bedienen sich nur einfacher Wundversuche, die auch mit wenig chirurgischer Erfahrung schnell und sicher durchführbar sind (172, 173). In der vorliegenden Studie musste jedoch aufgrund der Fragestellung ein komplexer Eingriff durchgeführt werden, der für einen erfolgreichen Abschluss sehr gute allgemein- und mikrochirurgische Kenntnisse und Fähigkeiten voraussetzt. Die mangelnde praktische Erfahrung des Autors in beiden Bereichen konnte nur bedingt durch die oben genannten Übungen ausgeglichen werden. Ein Ansatz für zukünftige Studien dieser Art wäre es, solche Versuche durch erfahrene, plastische oder experimentelle Chirurgen durchführen zu lassen. Alternativ könnte eine initiale, intensive Supervision von mehreren, gemeinsam durchgeführten Eingriffen die Erfolgsrate verbessern.

Ein weiterer Faktor ist der Einsatz eines Lappen-Modells, dessen Verwendung und Abläufe in der Arbeitsgruppe des Autors nicht etabliert waren. Das von Miyamoto und Koautoren (162) beschriebene Modell erweist sich in der Ausführung als schwierig, sodass eine höher als ursprünglich vorgesehene Tieranzahl für die Etablierung verwendet werden muss. Die dort berichteten Erfolgsraten sind – zumindest für unerfahrene Chirurgen – nicht reproduzierbar und erst einige Modifikationen erlaubten eine bessere Durchführbarkeit (163). Der Einsatz eines bereits erfolgreich etablierten und einfacher zu erlernenden Lappen-Modells, wie z. B. dem *Epigastric Skin Flap* (174), wäre für künftige Studien vorzuziehen.

7.1.2 Vorversuch

Im Rahmen des Vorversuchs wird ein günstiger Zeitraum zur Entnahme der Proben untersucht, wobei histologische Parameter und die Gefäßarchitektur zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation bewertet werden.

Ein Zeitraum von drei Tagen nach Operation erweist sich als zu kurz, da die Anastomosen dem Druck der Perfusion nicht standhalten und es zum Austritt des Kunstharzes an der Gefäßnaht kommt.

Histologisch zeigt sich an Tag drei noch keine signifikante Zunahme der Gefäßanzahl im Wundgebiet gegenüber dem am gleichen Tag entnommenem Kontrollgewebe. Im Kontrast dazu lässt sich eine signifikante Erhöhung der *microvessel area* feststellen, also der von den Gefäßen eingenommenen Fläche im Wundgebiet. Dies passt zu den von Tonnes et al. (175) gemachten Beobachtungen, dass peripher im Wundgebiet gelegene Gefäße bereits am dritten Tag hypertrophieren, aber erst ab dem vierten Tag eine Einsprossung von Kapillaren ins Wundgebiet beobachtet werden kann.

Folgerichtig kann auch in dieser Studie eine kontinuierliche Zunahme der Gefäßdichte in der postoperativen Zeit beobachtet werden, wobei der Unterschied zwischen Transplantat und Kontrolle an Tag zwölf am ausgeprägtesten ist. Die von Blutgefäßen eingenommene Fläche im Wundgebiet erreicht ihre maximale Ausprägung an Tag sieben und fiel an Tag zwölf wieder ab. Im Gegenzug ist die Gefäßdichte an Tag sieben geringer als an Tag zwölf (siehe Abbildung 7-1).

Hier zeigt sich eine Tendenz, dass die Hypertrophie und Einsprossung größerer Gefäße an Tag sieben ihren Höhepunkt erreicht und im Folgenden das grobe Gefäßnetz durch Umbauprozesse verfeinert wird: Wenige, großlumige Gefäße werden zu einem Netzwerk aus vielen, kleinlumigeren Gefäßen.

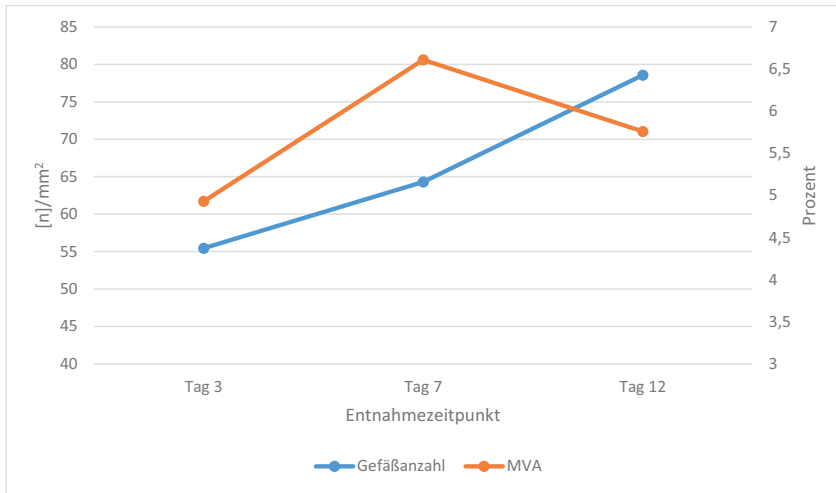


Abbildung 7-1 Grafische Darstellung der Entwicklung von Gefäßanzahl (blau) und MVA (orange) im Wundheilungsverlauf. Linke Skala bezogen auf Gefäßanzahl in Gefäßen pro mm², rechte Skala bezogen auf Gefäßoberfläche in Prozent. n = Anzahl, mm² = Quadratmillimeter, MVA = *microvessel area*

Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls in den REM-Untersuchungen bestätigen. Hier zeigt sich der Gefäßdurchmesser an Tag sieben gegenüber Tag zwölf signifikant erhöht. Ebenfalls ist der Unterschied zu den Kontrollgruppen an beiden Entnahmezeitpunkten signifikant.

Die Untersuchung der *intervascular distance* als Parameter für die Gefäßdichte zeigt, dass der mittlere Abstand der Gefäße zueinander in den Transplantaten signifikant größer ist als in den Kontrollen. An Tag sieben ist die IVD signifikant größer als an Tag zwölf. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, da die mit der Zeit steigende Anzahl der Gefäße im Transplantat eine Abnahme des Abstands der Gefäße zueinander bedingt. Eine vergleichbare Tendenz beobachten machen Phillips und Mitarbeiter bei Wundheilungsversuchen mit Ratten, bei denen eine Zunahme und Vergrößerung des Gefäßnetzwerks zwischen Tag sieben und 14 der Wundheilung beobachtet wird (176).

Bei der Messung der *interbranching distance* als Parameter für longitudinales Gefäßwachstum zeigen sich signifikante Unterschiede an Tag sieben zwischen Transplantat und Kontrolle, an Tag zwölf nicht. Auch zwischen Tag sieben und zwölf treten keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Ergebnisse lassen auf ein stärkeres Längenwachstum zu Beginn der Wundheilung schließen, bevor eine stärkere Verzweigung der Gefäße beginnt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen erst

ein verstärktes Sprossen und Einwachsen von neuen Kapillaren beobachtet wird, bevor eine verstärkte Verzweigung der Gefäße untereinander einsetzt (176, 177).

Die Messung der *branching angle* ergibt keine Unterschiede zwischen und innerhalb der Gruppen. Die BRA gibt die Winkelung der Gefäßaufzweigungen wieder und Veränderungen dieses Parameters sind häufig im Rahmen der spaltenden Angiogenese (IA) zu beobachten (178). Außerdem geben sie Auskunft über die Anpassung des Gefäßsystems an veränderte Strömungswiderstände und Änderungen des Blutdrucks. Eine Erklärung könnte sein, dass die Änderungen dieses Parameters erst zu einem späteren Zeitpunkt signifikant und messbar auftreten.

Bei der Auszählung von *pillars* und *sprouts* können weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede beobachtet werden. Dies stellt einen ungewöhnlichen Befund dar, da die Angiogenese eine essentielle Komponente der Wundheilung ist (106, 175). Der Anteil der spaltenden Angiogenese (IA) ist dabei allerdings unklar und in der Literatur wird nur von Angiogenese allgemein oder der sprossenden Angiogenese (SA) im Rahmen der Wundheilung berichtet (176).

Somit wäre im Rahmen dieses Vorversuchs zumindest eine erhöhte Anzahl von *sprouts* in den Transplantaten im Vergleich zur Kontrolle zu erwarten gewesen, da auch die anderen eigenen Ergebnisse deutlich eine Neovaskularisation der Transplantate zeigen. Eine mögliche Erklärung ist die Beobachtung, dass der Hauptteil der *sprouts* sich bereits früher im Verlauf der Wundheilung bildet und ab Tag sieben der Umbau der Gefäße im Vordergrund steht (176). Zur Abklärung dieses Sachverhalts müssten Gefäßausgusspräparate (*corrosion casts*) zu früheren Zeitpunkten entnommen werden. Dies gelingt in diesem Versuch nicht, da die Gefäßanastomosen dem Druck der Perfusion nicht standhalten und das Kunstharz an der Anastomosestelle austritt. Gegebenenfalls könnte versucht werden, das Transplantat distal der Anastomose zu perfundieren. Eine weitere Erklärung für die fehlenden Unterschiede könnte darin liegen, dass es aufgrund der Größe der Gefäßausgusspräparate schwierig ist, alle Teile des Präparates gleichmäßig zu untersuchen. Je nach gewähltem Bildausschnitt können so untersucherbedingte Fehlzählungen entstehen, falls im Verhältnis nur Abschnitte mit geringer Angiogenese-Aktivität untersucht werden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass sich der Hauptteil der Angiogenese im empfangenden Gewebe ereignet (179). Dies könnte durch Erweiterung der Cast-Entnahme um das Empfängergewebe untersucht werden.

Die Vergleiche mit den Kontrollgruppen lassen die Vermutung zu, dass die Umstrukturierung der Gefäßarchitektur mehr als zwölf Tage benötigt, um wieder zu den ursprünglichen Verhältnissen zurückzukehren. Zur genauen Bestimmung dieses Zeitraums sind weitere Untersuchungen notwendig, in denen der Beobachtungszeitraum erweitert wird.

Aus den Ergebnissen des Vorversuchs konnten insgesamt wertvolle Ergebnisse zur Entwicklung der Gefäßarchitektur in mikrovaskulären Lappentransplantaten gewonnen werden, die sich auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen lassen. Als Entnahmezeitpunkt für den Hauptversuch schied Tag drei aus den eingangs genannten Gründen aus. Da sich im Vergleich an Tag sieben deutlichere und mehr signifikante Unterschiede in den untersuchten Parametern ergaben, wurde dieser Untersuchungszeitraum für den Hauptversuch ausgewählt.

7.1.3 Hauptversuch

Eine ursprünglich geplante Messung der Zugfestigkeit der Wunden mittels Tensiometer (180) kann nicht durchgeführt werden, da sich die Wundränder zum Entnahmezeitpunkt als zu fragil erweisen. In anderen Untersuchungen ist eine Entnahme und Zugfestigkeitsmessung bereits fünf Tage nach einem Wundverschluss möglich gewesen (181). Allerdings handelt es sich um direkt und primär verschlossene Wunden, die vermutlich eine höhere Festigkeit als Transplantate aufweisen.

Ackermann (182) kann bereits bei Wundheilungsversuchen mit Mäusen zeigen, dass 24 Tage nach Beginn der Wundheilung keine signifikanten Unterschiede zwischen unterschiedlich vorbehandelten Tieren bestehen. Die dortige Empfehlung, die Zugfestigkeit zu einem noch späteren Zeitpunkt zu untersuchen, lässt sich vermutlich auch auf unsere Versuche übertragen. Zur Untersuchung dieses Parameters sind weitere Forschungen notwendig, bei denen die Probenentnahme mehr als 24 Tage nach Beginn der Wundheilung erfolgen sollte.

In den histologischen Untersuchungen kann eine signifikante Zunahme der Gefäßanzahl und der MVA in den Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe nachvollzogen werden. Dies zeigt einen positiven Einfluss der Behandlung mit endothelialen Vorläuferzellen (EPC) auf die Vaskularisation, der auch in anderen Studien im Tiermodell nachgewiesen werden konnte (13, 183). Eine neue Erkenntnis dieser Studie ist, dass auch in freien Lappentransplantaten eine erhöhte Gefäßdichte durch den Einsatz von EPC zu erzielen ist. Ebenfalls kann in der Arbeit gezeigt werden, dass die Applikationsart (subkutan oder intraarteriell) keinen Einfluss auf die Zunahme der Gefäßdichte hat.

Bei der Untersuchung der Proliferationsrate kann kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu der erhöhten Gefäßdichte in den Behandlungsgruppen, die eine erhöhte Proliferation voraussetzen würde. Eine Erklärung wäre eine initial durch die EPC erhöhte Proliferationsrate in den Behandlungsgruppen, die mit einem verstärkten Gefäßwachstum einhergeht. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme könnte die Proliferation wieder auf ein geringeres Maß abgesunken sein, sodass sich nur noch die erhöhte Gefäßanzahl histologisch nachvollziehen lässt. Diese Beobachtung lässt sich mit dem zeitlichen Ablauf der Angiogenese während der Wundheilung

vereinbaren, wonach der Hauptteil der Proliferation vor dem siebten Tag der Wundheilung stattfindet (184, 185) (siehe Abbildung 7-2).

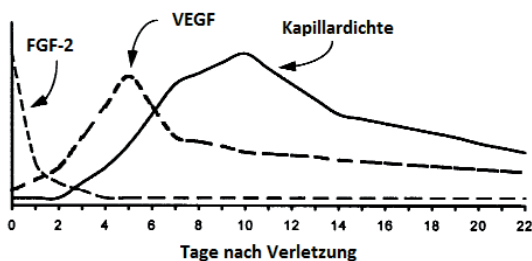


Abbildung 7-2: Postoperativer Verlauf der Entwicklung der Gefäßdichte (modifiziert nach (2)). Die stärkste Proliferation der Gefäße findet bereits vor dem 7. Tag der Wundheilung statt und in zeitlichem Zusammenhang zur Ausschüttung von VEGF. FGF-2 = *Fibroblast growth factor 2*, VEGF = *Vascular endothelial growth factor*.

Die Applikation von EPC hat keinen messbaren Einfluss auf die Entwicklung der Dicke der Hautschichten. Dies ist eine erwartbare Entwicklung, da die verpflanzten Gewebestücke in allen Gruppen eine ähnliche Dicke aufweisen und jeweils ein primärer Wundverschluss erfolgt. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Parameter in Modellen mit sekundär heilenden Wunden größere Aussagekraft erhält.

Bei der Untersuchung des Gefäßdurchmessers können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Im Zusammenhang mit der höheren Gefäßanzahl in den Behandlungsgruppen, scheint die Applikation von EPC keinen Einfluss auf die Gefäßgröße zu nehmen, dafür aber deren Anzahl positiv zu beeinflussen.

Die Untersuchung der *intervascular distance* (IVD) ergibt keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die IVD beschreibt als morphometrischer Parameter die Gefäßdichte in einem Korrosions-Präparat. Aufgrund der histologisch höheren Gefäßdichte in den Behandlungsgruppen wäre bei diesen ebenfalls eine signifikant niedrigere IVD zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung ist die Anfälligkeit der Rasterelektronenmikroskop (SEM) -Untersuchungen für Fehler von Seiten des Untersuchers. Während bei der histologischen Untersuchung die gesamte Länge des Präparats untersucht werden kann, wurden für die SEM-Untersuchungen Bildausschnitte gewählt. Sollten diese nicht repräsentativ für das ganze Präparat sein, kommt es zu Ungenauigkeiten.

Die *interbranching distance* (IBD) stellt ein morphometrisches Maß für das Längenwachstum der Gefäße dar und die *branching angle* (BRA) eine Anpassung an verschiedene Strömungsverhältnisse. Bei beiden Parametern kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Hieraus folgt, dass EPC keinen messbaren Einfluss auf die Gefäßarchitektur in freien Lappentransplantaten nehmen, der sieben Tage nach Applikation noch feststellbar wäre. Ob zu Beginn

der Heilung ein Unterschied besteht, müsste durch früher entnommene Korrosions-Präparate untersucht werden.

Die Untersuchung der *pillars* und *sprouts* ergibt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine mögliche Erklärung lässt sich – wie bei der Proliferationsrate - in der späten Entnahme der Präparate finden. Da ein Großteil der Angiogenese zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet (176), könnten sich dort messbare Unterschiede finden lassen. Dies müsste in weiteren Studien untersucht werden. Auf weitere mögliche Erklärungen wurde im vorigen Abschnitt eingegangen (siehe Kapitel 7.1.2). Die höhere Anzahl an *pillars* im Vergleich zu *sprouts* lässt insgesamt eine Tendenz erkennen, dass zum Entnahmezeitpunkt die Mehrzahl der Angiogenese durch Spaltung stattfindet und die Sprossung initial eine größere Rolle spielt. Dies passt zu der Annahme, nach der die IA zur Verfeinerung und Anpassung von kapillären Netzwerken an die Bedürfnisse des Blutstroms dient (186).

Insgesamt lässt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen ein positiver Einfluss auf die Neovaskularisation von Fernlappen-Transplantaten durch die Applikation von EPC nachweisen. Die Gefäßarchitektur wird hierbei nicht messbar verändert, da sich in den Untersuchungen der Gefäßausgänge keine signifikanten Unterschiede ergaben. Histologisch kann durch die Applikation von EPC eine signifikante Zunahme der Gefäßanzahl nachgewiesen werden. Ob sich hieraus eine verbesserte klinische Heilung ergibt, kann in dieser Studie aus zwei Gründen nicht untersucht werden. Erstens werden nur Tiere mit eingehheilten Transplantaten für die Untersuchungen verwendet, da Perfusion und Histologie von nekrotischen Lappen nicht durchzuführen sind. Zweitens wird die Zugdehnungsmessung als indirekter Parameter für die klinische Heilung aus den oben genannten Gründen nicht durchgeführt und somit ist keine Aussage über die Festigkeit der Wundränder möglich.

Trotzdem sollte man davon ausgehen, dass die vermehrte Vaskularisation zu einer verbesserten Wundheilung beiträgt, da dies in anderen Studien belegt wird. So zeigen Jaleel et al. (187) im Tiermodell an der Ratte, dass eine verminderte Gefäßdichte die Nekrose rate von lokalen Lappentransplantaten signifikant erhöht. Bitto und Mitarbeiter (188) können bei Stanzwunden bei diabetischen Mäusen einen schnelleren Wundverschluss und einen höheren Widerstand gegen Zugkraft nachweisen, die signifikant mit einer Zunahme der Gefäßdichte gegenüber einer Kontrollgruppe verbunden ist. In älteren Studien wird gezeigt, dass eine Inhibition der Angiogenese bei Mäusen zu Wundheilungsstörungen führt, wobei histologisch eine reduzierte Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar ist (189). Das Wachstum neuer Gefäße ermöglicht erst den Transport von Nährstoffen, Zellen und Sauerstoff in ein Wundgebiet und so lässt sich der Zusammenhang zwischen klinischer Heilung und Gefäßdichte erklären. Manche Studien zeigen auch, dass eine zu starke

Angiogenese die Wundheilung verschlechtern kann (190) und führen dies auf überschießende Entzündungsreaktionen und schlechtere Durchblutung der vielen Kapillaren zurück. Hinweise auf das „richtige“ Ausmaß an Angiogenese finden sich aktuell in der Literatur nicht.

In allen Untersuchungen hat die Applikationsart keinen Einfluss auf die Messergebnisse. Dies stellt eine neue Erkenntnis dar, die der bisherigen Vermutungen widerspricht, wonach eine intravaskuläre Injektion eine Verdünnung und damit einen geringeren Effekt der EPC bedingen würde (13). Die hier durchgeführte subkutane Injektion bzw. intraarterielle Instillation in das Transplantat selbst führt zu einer ausreichenden Ansammlung der EPC und somit kommen beide Methoden für mögliche Behandlungen in Frage. Nach Meinung des Autors ist die subkutane Injektion aus zwei Gründen trotzdem der intraarteriellen Instillation vorzuziehen: Erstens ist die subkutane Injektion technisch einfacher durchzuführen und zweitens lassen sich Irritationen der Gefäßstümpfe vermeiden, die bei der Manipulation der Gefäße durch die Instillation stattfinden können.

Dies kann die erhöhte Anzahl an Transplantatversagen in der Behandlungsgruppe 2 gegenüber den anderen Gruppen erklären. Durch die Manipulation auftretende Gefäßspasmen der den Lappen versorgenden Arterie können zur Minderperfusion und zur Nekrose des Lappens geführt haben. Auch eine Thrombose durch die instillierten EPC selbst stellt eine mögliche Erklärung dar. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wäre eine pathohistologische Untersuchung der nekrotischen Lappen mit besonderem Augenmerk auf die Anastomosen notwendig gewesen. In zukünftigen Studien sollte diese Fragestellung genauer betrachtet werden.

Andererseits stellt die wachsende Routine und praktische Erfahrung des Operateurs einen weiteren Faktor zur Verbesserung der Erfolgsraten im Verlauf der Studie dar und könnte bessere Erfolgsraten in Gruppe 3 erklären, da diese Tiere zuletzt operiert worden waren. Um diesen Faktor zu eliminieren, sollte in zukünftigen Studien die Zuteilung zu einer Behandlungsgruppe randomisiert erfolgen.

7.2 Limitationen und methodische Beschränkungen

Eine Limitation dieser Studie ist ihre Konzeption als Tierversuch mit Ratten als Modell, sodass sich die hier gewonnenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf andere Spezies übertragen lassen. Die Ratte wird als Versuchstier ausgewählt, da sie sich am besten für die hier untersuchte Fragestellung eignet. Einerseits müssen die Tiere eine ausreichende Größe zur Durchführung von mikrovaskulären Anastomosen haben, wodurch kleinere Tiere wie Mäuse nicht in Frage kommen. Andererseits müssen die Tiere immunsupprimiert verfügbar sein, um Abstoßungsreaktion der xenotransplantierten EPC zu vermeiden. Dies führt zum Ausschluss größerer Versuchstiere wie Hunde oder Schweine, die im Gegensatz zur Ratte nicht kommerziell immunsupprimiert werden.

Ein Nachteil der Verwendung von Ratten stellt die – im Gegensatz zum Menschen und Schwein - anders verlaufende (sekundäre) Wundheilung dar. Bei der Ratte findet diese hauptsächlich über myofibrilläre Kontraktion statt, beim Menschen jedoch über Granulation und Re-Epithelialisierung (191). Beim Hund steht ebenfalls die Epithelialisierung und eine Wundkontraktion aus der Mitte der Verletzung heraus im Vordergrund, bei der Katze eine Kontraktion der Wundränder (192). Da in dieser Studie jedoch Mechanismen der primären Wundheilung im Vordergrund stehen, lassen sich die Ergebnisse gut übertragen. Eine bessere Vergleichbarkeit könnte durch die Verwendung von Schweinen als Versuchstier erreicht werden, da diese die größte Ähnlichkeit zur menschlichen Wundheilung aufweisen (191).

Die xenogene Transplantation humaner EPC im Rattenmodell und die damit verbundene Frage möglicher Spender-Empfänger-Interaktionen stellt eine weitere potentielle Limitation dar. Körperfremde Zellen oder Gewebe werden vom Immunsystem des Empfängers normalerweise bekämpft. Dies erfolgt im Wesentlichen über T-Zellen, die fremde Zellen über die MHC- Proteine (*major histocompatibility complex*) erkennen (193).

Um diese Immunreaktion zu umgehen, gibt es zwei Möglichkeiten: Die erste besteht in der Verwendung weniger immunogener Zellen, d.h. körpereigener EPC des Empfängers (autogene Transplantation) oder EPC der gleichen Spezies (allogene Transplantation). Die zweite Möglichkeit erfordert die Suppression des Immunsystems des Empfängers, beispielsweise durch Medikamente.

Die Verwendung ratteneigener EPC wird bereits in einigen Studien erfolgreich durchgeführt, wobei die Tiere je nach Entnahmemethode dafür abgetötet (194) werden oder nur eine Sedation notwendig war (195). Da in der vorliegenden Studie jedoch die Effekte von humanen EPC untersucht werden sollten, wird auf die Möglichkeit der Immunsuppression zurückgegriffen. Die athymische Nacktratte stellt hierfür ein geeignetes Tiermodell dar, da ihr aufgrund eines Gendefekts die T-Zellen fehlen, die körperfremde Zellen über den Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (*major histocompatibility complex, MHC*) erkennen könnten (196). Darum wird sie auch in anderen Studien eingesetzt, in denen der erfolgreiche Einbau der EPC in Blutgefäße des Empfängertiers nachgewiesen werden kann (12, 197).

Es gibt jedoch auch Hinweise, dass eine Immunsuppression des Empfängers nicht notwendig ist, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern. Ladhoff und Mitarbeiter (2010) können zeigen, dass EPC bei allogener Transplantation einen immunprivilegierten Status haben und keine Abstoßung erfolgt (198). Möglicherweise gilt dies auch bei xenogener Verwendung: Lee et al. finden 2019 heraus, dass die intravenöse Applikation humaner EPC in Hunden keine adversen Reaktionen auslöst (199). In anderen Studien werden nicht-immunsupprimierte Versuchstiere mit humanen EPC behandelt, ohne dass

adverse Reaktionen beobachtet werden können. Darüber hinaus zeigen sich positive Effekte der EPC-Behandlung auf die Wundheilung bzw. Re-Endothelialisierung (200, 201).

Auch in der vorliegenden Studie lassen sich positive Effekte in der EPC-behandelten Gruppe auf die Neovaskularisation nachweisen, ohne dass adverse Effekte nachvollziehbar sind. Aufgrund dieser Resultate und den Ergebnissen in den oben genannten Studien kann davon ausgegangen werden, dass die humanen EPC im immunsupprimierten Rattenmodell nicht abgestoßen werden und eine vergleichbare Wirkung wie im menschlichen Organismus entfalten. Zum Vergleich wäre eine Untersuchung notwendig, bei welcher xenogene, allogene und autogene EPC verwendet werden.

Eine weitere Limitation stellt die geringe Gruppengröße, da nur jeweils sechs Tiere pro Versuchsgruppe in die histologischen bzw. rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen eingehen. Dies kann dazu führen, dass mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen nicht feststellbar sind. Die Untersuchung einer größeren Tieranzahl wäre notwendig, um hierüber Klarheit zu erreichen.

In welchem Ausmaß und auf welche Art die in dieser Studie nachgewiesenen proangiogenen Effekte der verwendeten Stammzellen zustande kommen, lässt sich leider nicht endgültig beantworten. Postuliert wird ein Einbau der EPC bzw. der von ihnen gebildeten EZ in neu gebildete Blutgefäße. Dies soll immunhistochemisch mittels einer CD31-Doppelfärbung nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen menschliche und rattenzugehörige CD31-Proteine hätten die EZ der unterschiedlichen Spezies dargestellt werden können. Dies erweist sich jedoch als nicht durchführbar, da die histologischen Schnitte der Belastung einer doppelten Inkubation nicht standhalten.

In anderen Studien (13, 15) werden EPCs vor ihrem Einsatz mit Dil gefärbt. Dil ist ein fluoreszierender, lipophiler Farbstoff, bindet an Zellmembranen und bildet dort stabile Verbindungen. Als Zusatz zu Nährmedien wird er in proliferierende Zellen eingebaut (202) und kann so in EPC-Kulturen verwendet werden. Da die Färbung auch nach Transplantation erhalten bleibt, können die EPC schließlich durch Fluoreszenzmikroskopie im histologischen Präparat nachgewiesen werden. Da sich in der vorliegenden Untersuchung die Schwierigkeiten mit der geplanten Färbung erst spät herausstellen, wird auf ein Wiederholen etlicher Operationen mit gefärbten EPC verzichtet. Die hier verwendeten Stammzellen entsprechen am ehesten der Definition der *circulating angiogenic cells* (CAC) aus der Gruppe der endothelialen Vorläuferzellen (EPC) (siehe Kapitel 4.6.2). Nach dieser Einteilung wäre die proangiogene Wirkung zum Großteil über parakrine Effekte der Zellen und nicht über eine direkte Inkorporation in neugebildete Gefäße zu vermuten (145). Es wäre die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen, dieser Fragestellung nachzugehen. Besonders interessant wäre ein Vergleich der hier verwendeten EPC mit *endothelial colony-forming cells* (ECFC) in Hinblick auf die unterschiedlichen proangiogenen Wirkungen

und Auswirkungen auf die Gefäßarchitektur. Es sollte eine Markierung der EPC mit Dil versucht werden, um den Einbau in die Blutgefäße zu untersuchen. So könnte auch untersucht werden, ob die subkutane oder intravaskuläre Applikation der EPC dabei zu Unterschieden führen.

Eine weitere Limitation stellt die fehlende Bewertung von funktionalen Parametern der Wundheilung dar. Die in anderen Studien häufig verwendete zeitliche Messung des Wundverschlusses ist aufgrund der vorgegebenen Fragestellung nicht heranziehbar und die Zugfestigkeit erweist sich als nicht auswertbar. Wie weiter oben beschrieben, sollte dies in künftigen Studien zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der Wundheilung untersucht werden, um die Auswirkungen der EPC auf die funktionelle Wundheilung bewerten zu können.

7.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie geben Hinweise darauf, dass der Einsatz von EPC die Vaskularisation und damit die Überlebensrate von mikrovaskulären Lappentransplantaten verbessern kann. Aktuell sind jedoch noch vielfältige Hürden auf dem Weg zu einem klinischen Einsatz zu nehmen.

So müssen die Anwendungssicherheit und Langzeitfolgen von EPC-Transplantationen in klinischen Studien am Patienten untersucht werden. In den Jahren von 2005 bis 2017 sind nur 26 klinische Studien mit EPC am Menschen registriert worden (157). Von diesen sind wiederum lediglich zwölf abgeschlossen und es werden unterschiedliche Definitionen und Gewinnungsarten von EPC verwendet (157). Verschiedene Studien können dort zeigen, dass bei unterschiedlichen Applikationsarten von EPC (intravenös, intraarteriell und subkutan) keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zu erwarten sind (203–205). Knochen- und Kopfschmerzen sowie Fieber erweisen sich als kurzfristige Nebenwirkungen (206), die über einen Beobachtungszeitraum von maximal einem Jahr beobachtet werden (205).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eine sichere und nebenwirkungsarme Anwendung von EPC am Menschen erwarten. Da jedoch keine einheitliche Definition von EPC verwendet wird, lassen sich die Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die hier verwendeten EPC übertragen. Vor einem therapeutischen Einsatz sollten zwei Voraussetzungen erfüllt werden: Erstens muss eine einheitliche Definition von EPC (207) allgemein akzeptiert und verwendet werden, um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu ermöglichen. Zweitens müssen anhand der Definitionen klinische Studien neu bewertet bzw. durchgeführt werden, um die Anwendungssicherheit und Langzeitfolgen der Behandlung mit den unterschiedlichen EPC zu bewerten.

Weiterhin unterliegt der Einsatz von Stammzellen in Deutschland strengen Richtlinien, allen voran dem Transplantationsgesetz (208). Dieses stellt hohe Anforderungen an die zu beachtenden Vorschriften in Bezug auf Gewinnung, Aufbewahrung und Verabreichung von Stammzellen, sodass nur ausgewählte Einrichtungen mit diesen am Menschen arbeiten dürfen. Vor einer klinischen Anwendung müsste

geklärt werden, ob es sich bei EPC um Stammzellen oder um Blutbestandteile handelt. Im ersten Fall würden EPC nur unter großen Hürden zu einer breiten klinischen Anwendung finden.

In der Veterinärmedizin gehört der Einsatz von Stammzellen in bestimmten Bereichen zum klinischen Alltag, vor allem im Pferde- und Kleintierbereich. Eingesetzt werden mesenchymale Stammzellen (MSC), die aus Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden. Anwendung finden Sie besonders bei der Behandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparats, wie Bändern, Sehnen oder Gelenken (209, 210). Inzwischen werden sowohl in den Vereinigten Staaten als auch in der Europäischen Union Richtlinien für die Zulassung von stammzellenbasierten Medikamenten erlassen. So wird beispielsweise 2019 ein Medikament zur Behandlung nicht-infektiöser Arthritiden bei Pferden auf Basis von MSC zugelassen (211). Auch bei der Behandlung von feliner chronischer Gingivostomatitis, chronischen entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD) und chronischen Hepatopathien können beim Kleintier positive Effekte bei intravenöser Applikation von MSC beobachtet werden (212). Hier handelt es sich jedoch noch um experimentelle Anwendungen ohne klinischen Einsatz.

EPC werden jedoch in der Tiermedizin noch nicht praktisch angewandt. Es gelingt zwar mehrfach die Isolation von EPC beim Hund aus peripherem Blut (213) und Knochenmark (214, 215), eine Untersuchung ihrer Eigenschaften in vivo und Vergleich mit humanen EPC ist jedoch noch nicht erfolgt. Die vielfältigen Tierstudien mit humanen oder auch speziesspezifischen EPC erfolgen bis jetzt meist an Nagetieren und wurden zur Applikation beim Menschen durchgeführt. Auch beim Kleintier wird nur der Einsatz humaner EPC untersucht, wobei eine verbesserte Heilung von urethralen Defekten nachgewiesen werden kann (216). In dieser und einer weiteren Studie werden nur geringe Nebenwirkungen im Sinne von veränderten Laborparametern festgestellt (199).

Aus ethischen Überlegungen ist jedoch von einer Anwendung humaner EPC zu therapeutischen Zwecken beim Tier abzusehen, sodass vor einem möglichen klinischen Einsatz noch experimentelle Studien zum Einsatz speziesspezifischer EPC beim Tier notwendig sind.

8 Zusammenfassung

Freie Lappentransplantate sind eine verbreitete, aber sehr anspruchsvolle Methode der plastischen Chirurgie zur Deckung komplizierter Wunden. Um Komplikationen bei diesen Eingriffen zu verringern, könnte der Einsatz von EPC nützlich sein. Diese Zellen haben in vielen Untersuchungen positive Effekte auf die Neovaskularisation von Geweben gezeigt. Teils bewirken sie über parakrine Effekte eine Steigerung der Angiogenese oder werden direkt in neue Gefäße inkorporiert.

In der vorliegenden Studie wird daher die Hypothese untersucht, dass EPC die Vaskularisation von freien Lappentransplantaten und damit deren Wundheilung verbessern. Im Tiermodell werden freie Lappen transplantiert, wobei zunächst die von Miyamoto und Kollegen beschriebene Operationsmethode (162) in einigen Punkten modifiziert werden muss, um die Erfolgsrate zu steigern. Ebenfalls werden im Rahmen eines Vorversuchs die Gefäßarchitektur und histologische Parameter zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten verglichen. Der siebte postoperative Tag wird als Entnahmezeitpunkt für den Hauptversuch ausgewählt, da sich hier die größten Unterschiede zwischen den Transplantaten und den Kontrollgeweben zeigen. Im Hauptversuch erhalten die Tiere entweder subkutan oder intraarteriell EPC bzw. in der Kontrollgruppe keine EPC.

An den entnommenen Transplantaten wird histologisch die Vaskularisation und elektronenmikroskopisch die Gefäßarchitektur untersucht. Auf eine Zugdehnungsmessung der Wundränder muss aufgrund der hohen Fragilität der Wundränder verzichtet werden. Histologisch kann eine signifikante Steigerung der Gefäßanzahl bei den Behandlungsgruppen um 39 % (EPC intraarteriell) bzw. 45 % (EPC subkutan) gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, wobei keine Applikationsart der EPC der anderen überlegen ist. Hinsichtlich der Dicke der Hautschichten und der Proliferationsrate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Untersuchung der dreidimensionalen Gefäßarchitektur (Gefäßdurchmesser, Gefäßabstand, Aufzweigungswinkel und Abstand der Gefäßaufzweigungen) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, welche gegebenenfalls zu einem früheren Untersuchungszeitpunkt darstellbar sein könnten. In den REM-Untersuchungen lässt sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten von *pillars* und *sprouts* feststellen, da vermutlich der Großteil der SA bereits vor dem Untersuchungszeitpunkt passiert und die IA erst anzulaufen beginnt.

Die aus anderen Anwendungsgebieten bekannten positiven Effekte der EPC auf die Neovaskularisation können anhand dieser Studie auch bei freien Lappentransplantaten nachgewiesen werden. Aufgabe zukünftiger Studien wäre es, die Art und Weise der proangiogenen Wirkungen zu untersuchen und den Einfluss der EPC auf die funktionelle Wundheilung, z.B. durch Überprüfung der Wundfestigkeit. Veterinärmedizinisch bedeutsam wäre die weitere Erforschung von speziesspezifischen EPC und deren Effekten im Tierkörper.

9 Summary

Free flap transfer has become a common technique in plastic surgery for closure of extensive defects but is technically demanding. EPC can promote neovascularization and are therefore a possible therapeutic target to minimize complications. These cells have shown their proangiogenic potential in various studies in different animal models and settings. While some induce angiogenesis via paracrine effects, others are directly incorporated into newly formed vessels.

The following study explored the hypothesis, that EPC increase the neovascularization in microvascular transferred free flaps and improve their wound healing. The rat was used as an animal model to transplant the free flaps using a previously described operation technique (162). The technique had to be modified to achieve sufficient flap survival rates.

A preliminary study investigated the effect of different times of sample taking on vascular architecture and histological parameters. As most changes occurred on the seventh post-operative day, this became the time interval for the main study. Here, the animals were given EPC s.c. or intraarterially and the control group received none.

Samples were taken for histological and SEM examination of the vasculature. Measurement of wound tensile strain could not be performed as the wounds proved to fragile. Histologically there was a significant increase in vessel numbers of 39 % (EPC intraarterially) and 45 % (EPC s.c.) in the treatment groups and no difference was observed regarding the application method. No significant differences were observed when measuring the width of the cutaneous layers and the proliferation rate.

The SEM analysis showed no significant differences in the vascular architecture (vessel diameter, vessel density, interbranching distance, branching angle), which might be detectable at earlier stages. Likewise, there was no significant difference in the appearance of pillars and sprouts. This is possibly due to the fact, that SA occurs earlier, and IA is just starting at the seventh day of wound healing.

This study could confirm the positive effects of EPC on neovascularization in free flap transfer as shown in previous studies in other applications. Future studies are necessary to determine the mode of the proangiogenic effect of the EPC and their effect on tensile strength of free flap wounds. In veterinary medicine there is need for further research of species-specific EPC and their effects in the respective animals.

10 Literatur

1. Medical gallery of Blausen Medical 2014. Wiki J Med 2014; 1(2). doi: 10.15347/wjm/2014.010.
2. Artery; 2021 [Stand: 03.03.2021]. Verfügbar unter: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artery>.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69(1):7–34. doi: 10.3322/caac.21551.
4. Kessler M, Ammer H, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Enke; 2013.
5. Baioni E, Scanziani E, Vincenti MC, Leschiera M, Bozzetta E, Pezzolato M et al. Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. BMC Vet Res 2017; 13(1):203. doi: 10.1186/s12917-017-1126-0.
6. Lafuente P, Whyte C. A Retrospective Survey of Injuries Occurring in Dogs and Handlers Participating in Canicross. Vet Comp Orthop Traumatol 2018; 31(5):332–8. doi: 10.1055/s-0038-1661390.
7. Adrian Dragu, Joanna Jeffries, Alexander D. Bach, Raymund E. Horch. Prinzipien der Lappenplastiken: Eine Übersicht. Chirurgische Allgemeine Zeitung 2008; 9.(2):59–66.
8. Bernsteen L, Gregory CR, Kyles AE, Wooldridge JD, Valverde CR. Renal transplantation in cats. Clin Tech Small Anim Pract 2000; 15(1):40–5. doi: 10.1053/svms.2000.7303.
9. Oesterwitz H, Ghods M, Geomelas M. Praktische Mikrochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
10. Kneser U, Horch RE, Lehnhardt M. Grundkurs Mikrochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016 [Stand: 20.11.2019].
11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275(5302):964–7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
12. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JJ, Uchida S, Masuda H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation 2001; 103(5):634–7. doi: 10.1161/01.cir.103.5.634.
13. Kubota Y, Kishi K, Satoh H, Tanaka T, Nakajima H, Nakajima T. Transplanted endothelial progenitor cells augment the survival areas of rat dorsal flaps. Cell Transplant 2003; 12(6):647–57. doi: 10.3727/000000003108747127.
14. Ziebart T, Yoon C-H, Trepels T, Wietelmann A, Braun T, Kiessling F et al. Sustained persistence of transplanted proangiogenic cells contributes to neovascularization and cardiac function after ischemia. Circ Res 2008; 103(11):1327–34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.180463.
15. Büttner K. Therapeutische Neovaskularisation durch embryonale endotheliale Progenitorzellen bei chronisch peripherer Ischämie am Kaninchenmodell. München; 2011.
16. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. The Lancet 2002; 360(9331):427–35. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09670-8.

17. Xie S, Chen B, Tao K, Han J-T, Wang H-T. The study on EPC originated from human umbilical cord blood promoting neovascularization in ischemic skin flap. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2007; 23(3):206–8.
18. König HE, Liebich H-G, Hrsg. Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 1166 Abbildungen, davon 1063 in Farbe und 103 Reproduktionen bildgebender Verfahren, sowie 53 Tabellen ; + Vet-Anatomie online: die Bilddatenbank mit 1000 ergänzenden Abbildungen und Texten. 6., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2015.
19. Liebich H-G, Budras K-D. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 4 Tabellen und 21 Übersichten zu differenzialdiagnostischen Merkmalen ; + Histologie online: die Bilddatenbank mit dem Plus. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2010. Verfügbar unter: <http://www.schattauer.de/liebich-2692.html>.
20. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage; 2019. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>.
21. Pavletic MM. Anatomy and circulation of the canine skin. *Microsurgery* 1991; 12(2):103–12. doi: 10.1002/micr.1920120210.
22. Epidermis (Wirbeltiere); 2019 [Stand: 07.11.2019]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=193047962>.
23. Pschyrembel W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2013. 264., überarb. Aufl. Berlin: de Gruyter; 2012.
24. Riede U-N, Werner M. Allgemeine und Spezielle Pathologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017 [Stand: 11.11.2019].
25. Kramer M, Hrsg. Kompendium der allgemeinen Veterinärchirurgie. Hannover: Schlüter; 2004. (Vet).
26. Siewert JR, Stein HJ, Allgöwer M. Chirurgie: Mit integriertem Fallquiz - 40 Fälle nach neuer AO. 9th ed. Dordrecht: Springer; 2012. (Springer-Lehrbuch).
27. Orgill DP, Blanco C. Biomaterials for Treating Skin Loss: Elsevier Science; 2009. Verfügbar unter: <https://books.google.de/books?id=-6yjAgAAQBAJ>.
28. File:Wound healing phases.png - Wikipedia [Stand: 18.11.2019]. Verfügbar unter: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Wound_healing_phases.png.
29. Brandes R, Lang F, Schmidt RF. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 32. Auflage; 2019. (Springer-Lehrbuch).
30. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflam* 2019; 2019:3706315. doi: 10.1155/2019/3706315.
31. Engelhardt Wv, Breves G, Aurich C, Hrsg. Physiologie der Haustiere. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010.
32. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *IJMS* 2016; 17(12):2085. doi: 10.3390/ijms17122085.
33. Weiterbildungsordnung für Ärztinnen und Ärzte in Hessen: Nach den Beschlüssen der Delegiertenversammlung vom 02. Juli 2005. *Hessisches Ärzteblatt* 2005; (10) [Stand: 01.01.2020]. Verfügbar unter: https://www.laekh.de/images/Hessisches_Aerzteblatt/2005/HAEBL_10_2005.pdf.

34. Weiterbildungsordnung der Landestierärztekammer Hessen. Deutsches Tierärzteblatt 2019; (10) [Stand: 01.01.2020]. Verfügbar unter: https://www.ltk-hessen.de/fileadmin/www_ltk_hessen_de/WB_0919/Weiterbildungsordnung_10-19.pdf.
35. Ehrhardt. Ist das Kupieren der Hunde als Tierquälerei zu beurteilen? Schweizer Archiv für Tierheilkunde 1923; 65(65):138–48 [Stand: 01.01.2020]. Verfügbar unter: <https://www.e-periodica.ch/digbib/view?pid=sat-003:1923:65::667#157>.
36. Overgaauw PAM, Vinke CM, van Hagen MAE, Lipman LJA. A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. Int J Environ Res Public Health 2020; 17(11). doi: 10.3390/ijerph17113789.
37. Anne Osburg. Die Weiterbildung zum Fachtierarzt / zur Fachtierärztin in Deutschland - Ursprung, Entwicklung, Zukunft [Dissertation]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover.
38. Francis Veterinary Hospital. Reconstructive and Cosmetic Surgery | Francis Veterinary Hospital; 2021 [Stand: 20.03.2021]. Verfügbar unter: <https://francisvet.com/services/surgical-procedures/reconstructive-and-cosmetic-surgery/>.
39. Neumann S. Cosmetic surgery: customer service or professional misconduct. Can Vet J 2008; 49(5):501–4.
40. Tierschutzgesetz: TierSchG; 1972 [Stand: 09.01.2020]. Verfügbar unter: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>.
41. Munro HM, Thrusfield MV. 'Battered pets': non-accidental physical injuries found in dogs and cats. J Small Anim Pract 2001; 42(6):279–90. doi: 10.1111/j.1748-5827.2001.tb02041.x.
42. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3rd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; op. 2010.
43. Fossum TW, Hrsg. Small animal surgery. Fifth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2019.
44. Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen. Rekonstruktive Chirurgie - Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen; 2021 [Stand: 28.09.2022]. Verfügbar unter: <https://www.dgpraec.de/plastische-chirurgie/rekonstruktive-chirurgie/>.
45. Miller CC, Fowler JD, Bowen CV, Chang P. Experimental and clinical free cutaneous transfers in the dog. Microsurgery 1991; 12(2):113–7. doi: 10.1002/micr.1920120211.
46. Szentimrey D. Principles of reconstructive surgery for the tumor patient. Clin Tech Small Anim Pract 1998; 13(1):70–6. doi: 10.1016/S1096-2867(98)80031-5.
47. Martin EA, Hrsg. Concise medical dictionary. 9th ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 2015. (Oxford reference).
48. Buchanan PJ, Kung TA, Cederna PS. Evidence-Based Medicine: Wound Closure. Plast Reconstr Surg 2016; 138(3 Suppl):257S-270S. doi: 10.1097/PRS.0000000000002775.
49. Hausamen J-E, Machtens E, Reuther J, Eufinger H, Kübler A, Schliephake H. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: Operationslehre und -atlas. 4. Aufl. s.l.: Springer-Verlag; 2012.
50. Stell PM. The viability of skin flaps. Ann R Coll Surg Engl 1977; 59(3):236–41.
51. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. British Journal of Plastic Surgery 1973; 26(3):202–13. doi: 10.1016/0007-1226(73)90003-9.

52. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plast Reconstr Surg* 1981; 67(2):177–87.
53. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *British Journal of Plastic Surgery* 1987; 40(2):113–41. doi: 10.1016/0007-1226(87)90185-8.
54. Geddes CR, Morris SF, Neligan PC. Perforator flaps: evolution, classification, and applications. *Ann Plast Surg* 2003; 50(1):90–9. doi: 10.1097/00000637-200301000-00016.
55. Gosain A, Chang N, Mathes S, Hunt TK, Vasconez L. A study of the relationship between blood flow and bacterial inoculation in musculocutaneous and fasciocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86(6):1152–62; discussion 1163.
56. Takushima A, Harii K, Asato H, Ueda K, Yamada A. Neurovascular free-muscle transfer for the treatment of established facial paralysis following ablative surgery in the parotid region. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113(6):1563–72. doi: 10.1097/01.prs.0000117186.10112.87.
57. Chepeha DB, Moyer JS, Bradford CR, Prince ME, Marentette L, Teknos TN. Osseocutaneous radial forearm free tissue transfer for repair of complex midfacial defects. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131(6):513–7. doi: 10.1001/archotol.131.6.513.
58. Cormack GC, Lamberty BGH. *The arterial anatomy of skin flaps*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.
59. Pavletic MM. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. Fourth edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2018. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119267539>.
60. Papazoglou Lysimachos G. *Paradigm Shifts in Small Animal Plastic and Reconstructive Surgery*. *General Surgery Reports* 2017; (1):3.
61. Field EJ, Kelly G, Pleuvry D, Demetriou J, Baines SJ. Indications, outcome and complications with axial pattern skin flaps in dogs and cats: 73 cases. *J Small Anim Pract* 2015; 56(12):698–706. doi: 10.1111/jsap.12400.
62. Kurach L, Smith MEH, Fowler JD. Microvascular free tissue transfer of the trapezius flap in 20 dogs and a wallaby. *Vet Surg* 2013; 42(2):170–5. doi: 10.1111/j.1532-950X.2012.01029.x.
63. MILLER CW, CHANG P, BOWEN V. Identification and Transfer of Free Cutaneous Flaps by Microvascular Anastomosis in the Dog. *Vet Surgery* 1986; 15(2):199–204. doi: 10.1111/j.1532-950X.1986.tb00205.x.
64. Miller CW, Bowen V, Chang P. Microvascular distant transfer of a cervical axial-pattern skin flap in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190(2):203–4.
65. Fowler JD, Miller CW, Bowen V, Johnston GH. Transfer of free vascular cutaneous flaps by microvascular anastomosis. Results in six dogs. *Vet Surgery* 1987; 16(6):446–50. doi: 10.1111/j.1532-950x.1987.tb00985.x.
66. Fowler JD, Degner DA, Walshaw R, Walker D. Microvascular free tissue transfer: results in 57 consecutive cases. *Vet Surg* 1998; 27(5):406–12. doi: 10.1111/j.1532-950x.1998.tb00147.x.
67. Basher AW, Fowler JD, Bowen CV. Free tissue transfer of digital food pads for reconstruction of the distal limb in the dog. *Microsurgery* 1991; 12(2):118–24. doi: 10.1002/micr.1920120212.

68. Liu C-H, Yeh L-S. A vascularized preputial free flap for labial reconstruction in a dog. *Vet Surgery* 2017; 46(8):1116–9. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.uni-giessen.de/doi/pdf/10.1111/vsu.12694>.
69. Marré D, Hrsg. *Fundamental topics in plastic surgery*. Stuttgart, New York: Thieme; 2018.
70. Saint-Cyr M, Wong C, Buchel EW, Colohan S, Pederson WC. Free tissue transfers and replantation. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130(6):858e–878e. doi: 10.1097/PRS.0b013e31826da2b7.
71. Wei FC, Demirkan F, Chen HC, Chen IH. Double free flaps in reconstruction of extensive composite mandibular defects in head and neck cancer. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103(1):39–47. doi: 10.1097/00006534-199901000-00008.
72. Baccarani A, Starnoni M, Zaccaria G, Anesi A, Benanti E, Spaggiari A et al. Obturator Nerve Split for Gracilis Free-flap Double Reinnervation in Facial Paralysis. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2019; 7(6):e2106. doi: 10.1097/GOX.0000000000002106.
73. Lin P-Y, Cabrera R, Chew K-Y, Kuo Y-R. The outcome of free tissue transfers in patients with hematological diseases: 20-year experiences in single microsurgical center. *Microsurgery* 2014; 34(7):505–10. doi: 10.1002/micr.22243.
74. Lese I, Biedermann R, Constantinescu M, Grobbelaar AO, Olariu R. Predicting risk factors that lead to free flap failure and vascular compromise: A single unit experience with 565 free tissue transfers. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2021; 74(3):512–22. doi: 10.1016/j.bjps.2020.08.126.
75. Chang DW, Wang B, Robb GL, Reece GP, Miller MJ, Evans GR et al. Effect of obesity on flap and donor-site complications in free transverse abdominis myocutaneous flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105(5):1640–8. doi: 10.1097/00006534-200004050-00007.
76. Liu Z, Tian Z, Zhang C, Sun J, Zhang Z, He Y. Microvascular reconstruction in elderly oral cancer patients: does diabetes status have a predictive role in free flap complications? *J Oral Maxillofac Surg* 2015; 73(2):357–69. doi: 10.1016/j.joms.2014.08.009.
77. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther* 2014; 31(8):817–36. doi: 10.1007/s12325-014-0140-x.
78. Bhamra PK, Patel SA, Khan U, Bhrany AD, Futran ND. Head and neck free flap reconstruction in patients older than 80 years. *J Reconstr Microsurg* 2014; 30(8):523–30. doi: 10.1055/s-0034-1384664.
79. Mlodinow AS, Halen JP, Rambachan A, Gaido J, Kim JYS. Anemia is not a predictor of free flap failure: a review of NSQIP data. *Microsurgery* 2013; 33(6):432–8. doi: 10.1002/micr.22107.
80. Kuo Y-R, Yang KD, Yang M-Y, Lo Huang M-N, Lin C-W, Lin F-C et al. Reactive thrombocytosis alone does not affect the patency of microvascular anastomosis in the splenectomy rat. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110(3):812–7. doi: 10.1097/00006534-200209010-00014.
81. Bengtson BP, Schusterman MA, Baldwin BJ, Miller MJ, Reece GP, Kroll SS et al. Influence of prior radiotherapy on the development of postoperative complications and success of free tissue transfers in head and neck cancer reconstruction. *The American Journal of Surgery* 1993; 166(4):326–30. doi: 10.1016/S0002-9610(05)80325-3.
82. Wong AK, Joanna Nguyen T, Peric M, Shahabi A, Vidar EN, Hwang BH et al. Analysis of risk factors associated with microvascular free flap failure using a multi-institutional database. *Microsurgery* 2015; 35(1):6–12. doi: 10.1002/micr.22223.

83. Bui DT, Cordeiro PG, Hu Q-Y, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119(7):2092–100. doi: 10.1097/01.prs.0000260598.24376.e1.
84. Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98(7):1230–3. doi: 10.1097/00006534-199612000-00017.
85. Khouri RK, Shaw WW. Reconstruction of the lower extremity with microvascular free flaps: a 10-year experience with 304 consecutive cases. *J Trauma* 1989; 29(8):1086–94. doi: 10.1097/00005373-198908000-00005.
86. Amoroso M, Apelgren P, Elander A, Säljö K, Kölby L. The effect of hemodilution on free flap survival: A systematic review of clinical and experimental studies. *Clin Hemorheol Microcirc* 2020; 75(4):457–66. doi: 10.3233/CH-200832.
87. Singh P, Fu Zhu L, Dziegielewski P, Seikaly H. Effect of intraoperative dopamine on free flap survival in a rat model: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2012; 41 Suppl 1:S71-4.
88. Abdelfattah U, Elbanoby T, Kim EN, Park EJ, Suh HP, Hong JPY. Effect of Simvastatin Use in Free Tissue Transfer: An Experimental Study in a Rat Epigastric Free Flap Model. *J Reconstr Microsurg* 2020; 36(4):281–8. doi: 10.1055/s-0039-1701030.
89. Angel MF, Im MJ, Chung HK, Vander Kolk CA, Manson PN. Effects of combined cold and hyperbaric oxygen storage on free flap survival. *Microsurgery* 1994; 15(9):648–51. doi: 10.1002/micr.1920150909.
90. Mücke T, Borgmann A, Fichter AM, Wagenpfeil S, Mitchell DA, Ritschl LM et al. The influence of different VEGF administration protocols on the perfusion of epigastric flaps in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51(6):555–62. doi: 10.1016/j.bjoms.2012.09.007.
91. Angelos PC, Winn SR, Kaurin DS, Holland J, Wax MK. Evaluating revascularization and flap survival using vascular endothelial growth factor in an irradiated rat model. *Archives of facial plastic surgery* 2011; 13(3):185–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21242418/>.
92. Jacobson J, Suarez E. Microsurgery in the anastomosis of small vessels. *Surg Forum* 1960; 11:243–5.
93. Cobbett J. Small vessel anastomosis. A comparison of suture techniques. *British Journal of Plastic Surgery* 1967; 20(1):16–20. doi: 10.1016/s0007-1226(67)80003-1.
94. Buncke HJ, Schulz WP. Total ear reimplantation in the rabbit utilising microminiature vascular anastomoses. *British Journal of Plastic Surgery* 1966; 19(1):15–22. doi: 10.1016/s0007-1226(66)80003-6.
95. Daniel RK, Taylor GI. Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses. A clinical technique. *Plast Reconstr Surg* 1973; 52(2):111–7. doi: 10.1097/00006534-197308000-00001.
96. Koshima I, Inagawa K, Yamamoto M, Moriguchi T. New microsurgical breast reconstruction using free paraumbilical perforator adiposal flaps. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106(1):61–5. doi: 10.1097/00006534-200007000-00011.
97. Nasisse MP. Principles of Microsurgery. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1997; 27(5):987–1010. doi: 10.1016/S0195-5616(97)50102-1.

98. Gregory CR. Status of renal transplantation in the 1990s. *Semin Vet Med Surg Small Anim* 1992; 7(3):183–6.
99. Teixeira LG, Ataíde MW de, Milech V, Gavioli FB, Antunes BN, Abati SL et al. Urethral prolapse corrected by microsurgery in a cat: a case report. *J Vet Med Sci* 2017; 79(12):2023–5. doi: 10.1292/jvms.17-0280.
100. NYLEN CO. The microscope in aural surgery, its first use and later development. *Acta Otolaryngol Suppl* 1954; 116:226–40.
101. Oesterwitz H, Ghods M, Geomelas M. *Praktische Mikrochirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [Stand: 20.11.2019].
102. <https://www.facebook.com/VetMed.Illinois>. Microsurgery at Illinois - Veterinary Medicine at Illinois [Stand: 28.11.2019]. Verfügbar unter: <https://vetmed.illinois.edu/vet-resources/continuing-education/microsurgery-at-illinois/>.
103. Henrich U, de h. International Microsurgery Teaching Course | Teaching Schedule; 2019 [Stand: 28.11.2019]. Verfügbar unter: <https://www.microsurgerycourse.de/teachingschedule.html>.
104. Tsai Y-T, Lin T-S. The suitability of end-to-side microvascular anastomosis in free flap transfer for limb reconstruction. *Ann Plast Surg* 2012; 68(2):171–4. doi: 10.1097/SAP.0b013e3182275cf8.
105. Ahmadi I, Herle P, Miller G, Hunter-Smith DJ, Leong J, Rozen WM. End-to-End versus End-to-Side Microvascular Anastomosis: A Meta-analysis of Free Flap Outcomes. *J Reconstr Microsurg* 2017; 33(6):402–11. doi: 10.1055/s-0037-1599099.
106. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671–4. doi: 10.1038/386671a0.
107. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73–91. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
108. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development* 2001; 100(2):157–63. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00522-0.
109. Marone G, Hrsg. *Angiogenesis, lymphangiogenesis and clinical implications: ... 8 tables*. 1. Aufl. Basel, Freiburg: Karger; 2014. (Chemical Immunology and Allergy; Bd. 99).
110. Hunter J. A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds. 1794. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 458:27–34. doi: 10.1097/BLO.0b013e31803dd01c.
111. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21):1182–6. doi: 10.1056/NEJM197111182852108.
112. Adair TH, Montani J-P. *Angiogenesis*. San Rafael (CA); 2010.
113. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; 228(1):35–45. doi: 10.1002/ar.1092280107.
114. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 2008; 4(4):241–6. doi: 10.4161/org.4.4.7414.
115. van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2):203–12. doi: 10.1093/cvr/cvm102.
116. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347):298–307. doi: 10.1038/nature10144.

117. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2(6):283–95. doi: 10.1089/wound.2012.0398.
118. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004; 231(3):474–88. doi: 10.1002/dvdy.20184.
119. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 2009; 12(2):113–23. doi: 10.1007/s10456-009-9129-5.
120. Kressin M, Brehm R, Schnorr B. *Embryologie der Haustiere. 7., völlig überarbeitete Auflage;* 2019.
121. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Embryologie: Die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus. 5., überarbeitete Auflage.* Stuttgart: Schattauer; 2017.
122. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005; 105(3):1068–77. doi: 10.1182/blood-2004-03-1051.
123. Ratajska A, Jankowska-Steifer E, Czarnowska E, Olkowski R, Gula G, Niderla-Bielińska J et al. Vasculogenesis and Its Cellular Therapeutic Applications. *Cells Tissues Organs (Print)* 2017; 203(3):141–52. doi: 10.1159/000448551.
124. Velazquez OC. Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg* 2007; 45 Suppl A:A39–47. doi: 10.1016/j.jvs.2007.02.068.
125. Florey HW, Greer SJ, Poole JCF, Werthessen NT. The Pseudointima Lining Fabric Grafts of the Aorta. *Br J Exp Pathol* 1961; 42(3):236–46.
126. Stump MM, Jordan GL, Bakey ME de, Halpert B. Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol* 1963; 43(3):361–7.
127. Yoder MC, Ingram DA. Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol* 2009; 16(4):269–73. doi: 10.1097/MOH.0b013e32832bbcab.
128. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol* 2014; 229(1):10–6. doi: 10.1002/jcp.24423.
129. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 1984; 99(6):2034–40. doi: 10.1083/jcb.99.6.2034.
130. Zschäbitz A, Stofft E. Bindungsstudien mit Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA-I) am Gefäßendothel der Synovialmembran. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1988; 126(5):579–81. doi: 10.1055/s-2008-1044487.
131. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 2009; 114(3):723–32. doi: 10.1182/blood-2009-02-205930.
132. Hassan NF, Campbell DE, Douglas SD. Purification of human monocytes on gelatin-coated surfaces. *Journal of Immunological Methods* 1986; 95(2):273–6. doi: 10.1016/0022-1759(86)90415-1.

133. Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2003; 522:59–74. doi: 10.1007/978-1-4615-0169-5_7.
134. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 2007; 21(6):1141–9. doi: 10.1038/sj.leu.2404676.
135. Hill JM, Zalos G, Halcox J, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348(7):593–600. doi: 10.1056/NEJMoa022287.
136. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* 2010; 3:18. doi: 10.1186/1755-8794-3-18.
137. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109(5):1801–9. doi: 10.1182/blood-2006-08-043471.
138. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104(9):2752–60. doi: 10.1182/blood-2004-04-1396.
139. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood* 2007; 109(11):4761–8. doi: 10.1182/blood-2006-12-062471.
140. Yoon C-H, Hur J, Park K-W, Kim J-H, Lee C-S, Oh I-Y et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005; 112(11):1618–27. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433.
141. Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S et al. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(20):2232–43. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.081.
142. Jung HS, Kim MJ, Hong SH, Lee YJ, Kang S, Lee H et al. The potential of endothelial colony-forming cells to improve early graft loss after intraportal islet transplantation. *Cell Transplant* 2014; 23(3):273–83. doi: 10.3727/096368912X661364.
143. Rohde E, Schallmoser K, Reinisch A, Hofmann NA, Pfeifer T, Fröhlich E et al. Pro-angiogenic induction of myeloid cells for therapeutic angiogenesis can induce mitogen-activated protein kinase p38-dependent foam cell formation. *Cytotherapy* 2011; 13(4):503–12. doi: 10.3109/14653249.2010.536214.
144. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107(8):1164–9. doi: 10.1161/01.cir.0000058702.69484.a0.
145. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 2011; 29(11):1650–5. doi: 10.1002/stem.745.
146. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 106(5):1525–31. doi: 10.1182/blood-2005-04-1509.

147. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 105(7):2783–6. doi: 10.1182/blood-2004-08-3057.
148. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107(9):1322–8. doi: 10.1161/01.cir.0000055313.77510.22.
149. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85(3):221–8. doi: 10.1161/01.res.85.3.221.
150. Gallagher KA, Liu Z-J, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007; 117(5):1249–59. doi: 10.1172/JCI29710.
151. Bauer SM, Goldstein LJ, Bauer RJ, Chen H, Putt M, Velazquez OC. The bone marrow-derived endothelial progenitor cell response is impaired in delayed wound healing from ischemia. *J Vasc Surg* 2006; 43(1):134–41. doi: 10.1016/j.jvs.2005.08.038.
152. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 2007; 21(12):1546–58. doi: 10.1101/gad.436307.
153. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res* 2009; 69(18):7243–51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0167.
154. Zhang H, Chen F, Xu C, Ping Y, Wang Q, Liang Z et al. Incorporation of endothelial progenitor cells into the neovasculature of malignant glioma xenograft. *J Neurooncol* 2009; 93(2):165–74. doi: 10.1007/s11060-008-9757-4.
155. Chen X, Fang J, Wang S, Liu H, Du X, Chen J et al. A new mosaic pattern in glioma vascularization: exogenous endothelial progenitor cells integrating into the vessels containing tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget* 2014; 5(7):1955–68. doi: 10.18632/oncotarget.1885.
156. Zhao X, Liu H-Q, Li J, Liu X-L. Endothelial progenitor cells promote tumor growth and progression by enhancing new vessel formation. *Oncol Lett* 2016; 12(2):793–9. doi: 10.3892/ol.2016.4733.
157. Keighron C, Lyons CJ, Creane M, O'Brien T, Liew A. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5:354. doi: 10.3389/fmed.2018.00354.
158. Marx C, Silveira MD, Beyer Nardi N. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev* 2015; 24(7):803–13. doi: 10.1089/scd.2014.0407.
159. Upchurch DA, Renberg WC, Roush JK, Milliken GA, Weiss ML. Effects of administration of adipose-derived stromal vascular fraction and platelet-rich plasma to dogs with osteoarthritis of the hip joints. *Am J Vet Res* 2016; 77(9):940–51. doi: 10.2460/ajvr.77.9.940.
160. Hall MN, Rosenkrantz WS, Hong JH, Griffin CE, Mendelsohn CM. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Ther* 2010; 11(2):E1-14.
161. Smith R KW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a

- potential novel treatment. *Equine Vet J* 2003; 35(1):99–102. doi: 10.2746/042516403775467388.
162. Miyamoto S, Takushima A, Okazaki M, Shiraishi T, Minabe T, Harii K. 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* 2008; 61(2):209–14. doi: 10.1097/SAP.0b013e318157a6ea.
163. Pabst AM, Jäger L, Ackermann M, Konerding MA. Modified free pectoral skin flaps in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2015; 53(9):891–3. doi: 10.1016/j.bjoms.2015.07.011.
164. Kelly P, Denver P, Satchell SC, Ackermann M, Konerding MA, Mitchell CA. Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APP^{swe}/PS1^{dE9} model of Alzheimer's disease. *Angiogenesis* 2017; 20(4):567–80. doi: 10.1007/s10456-017-9568-3.
165. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966; 30(1):23–38. doi: 10.1083/jcb.30.1.23.
166. González-Magaña A, Blanco FJ. Human PCNA Structure, Function and Interactions. *Biomolecules* 2020; 10(4). doi: 10.3390/biom10040570.
167. Malkusch W, Konerding MA, Klapthor B, Bruch J. A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. *Anal Cell Pathol* 1995; 9(1):69–81.
168. Dixon WJ. *BMDP Statistical Software Manual [Volume 1 and 2]*. Berkeley: University of California Press; 1993.
169. Levin LS. The reconstructive ladder. An orthoplastic approach. *Orthop Clin North Am* 1993; 24(3):393–409.
170. Lascar I, Totir D, Cinca A, Cortan S, Stefanescu A, Bratianu R et al. Training program and learning curve in experimental microsurgery during the residency in plastic surgery. *Microsurgery* 2007; 27(4):263–7. doi: 10.1002/micr.20352.
171. Casal D, Pais D, Iria I, Mota-Silva E, Almeida M-A, Alves S et al. A Model of Free Tissue Transfer: The Rat Epigastric Free Flap. *J Vis Exp* 2017; (119). doi: 10.3791/55281.
172. Lee TW, Kwon YW, Park GT, Do EK, Yoon JW, Kim S-C et al. Atrial natriuretic peptide accelerates human endothelial progenitor cell-stimulated cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen* 2018; 26(2):116–26. doi: 10.1111/wrr.12641.
173. Ackermann M, Wolloscheck T, Wellmann A, Li VW, Li WW, Konerding MA. Priming with a combination of proangiogenic growth factors enhances wound healing in streptozotocin-induced diabetes in mice. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 2011; 47(2). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21720165/>.
174. Zhang F, Sones WD, Lineaweaver WC. Microsurgical flap models in the rat. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17(3):211–21. doi: 10.1055/s-2001-14353.
175. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* 2000; 5(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11147674/>.
176. Phillips GD, Whitehead RA, Knighton DR. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. *Am J Anat* 1991; 192(3):257–62. doi: 10.1002/aja.1001920305.

177. Fukuhara S. Live Imaging of Angiogenesis during Wound Healing. *Yakugaku Zasshi* 2020; 140(4):513–9. doi: 10.1248/yakushi.19-00221-2.
178. Ackermann M, Tsuda A, Secomb TW, Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive remodeling of vascular branch angles in chemically-induced murine colitis. *Microvasc Res* 2013; 87:75–82. doi: 10.1016/j.mvr.2013.02.002.
179. Pabst AM, Kämmerer PW, Krüger M, Jäger L, Ackermann M. Vascular architecture in free flaps: Analysis of vessel morphology and morphometry in murine free flaps. *Microvasc Res* 2018; 118:128–36. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29577940/>.
180. Wolloscheck T, Gaumann A, Terzic A, Heintz A, Junginger T, Konerding MA. Inguinal hernia: measurement of the biomechanics of the lower abdominal wall and the inguinal canal. *Hernia* 2004; 8(3):233–41. doi: 10.1007/s10029-004-0224-7.
181. Pickett BP, Burgess LP, Livermore GH, Tzikas TL, Vossoughi J. Wound healing. Tensile strength vs healing time for wounds closed under tension. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(5):565–8. doi: 10.1001/archotol.1996.01890170097017.
182. Ackermann M. Optimierung der Wundheilung durch Vorbehandlung mit proangiogenen Wachstumsfaktoren. Mainz; 2010.
183. Jin Z, Yao C, Poonit K, Han T, Li S, Huang Z et al. Allogenic endothelial progenitor cell transplantation increases flap survival through an upregulation of eNOs and VEGF on venous flap survival in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2019; 72(4):581–9. doi: 10.1016/j.bjps.2018.12.042.
184. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vascular and endovascular surgery* 2005; 39(4):293–306. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16079938/>.
185. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152(6):1445–52.
186. Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis* 2014; 17(3):499–509. doi: 10.1007/s10456-014-9428-3.
187. Jaleel Z, Blasberg E, Troiano C, Montanaro P, Mazzilli S, Gertje HP et al. Association of vaping with decreased vascular endothelial growth factor expression and decreased microvessel density in cutaneous wound healing tissue in rats. *Wound Repair Regen* 2021; 29(6):1024–34. doi: 10.1111/wrr.12945.
188. Bitto A, Irrera N, Minutoli L, Calò M, Lo Cascio P, Caccia P et al. Relaxin improves multiple markers of wound healing and ameliorates the disturbed healing pattern of genetically diabetic mice. *Clin Sci (Lond)* 2013; 125(12):575–85. doi: 10.1042/CS20130105.
189. Klein SA, Bond SJ, Gupta SC, Yacoub OA, Anderson GL. Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits murine cutaneous wound healing. *The Journal of surgical research* 1999; 82(2):268–74. doi: 10.1006/jsre.1998.5551.
190. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol* 2016; 100(5):979–84. doi: 10.1189/jlb.4mr0316-102r.
191. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *J Invest Dermatol* 2018; 138(10):2095–2105.e1. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.005.

192. Bohling MW, Henderson RA, Swaim SF, Kincaid SA, Wright JC. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Vet Surgery* 2004; 33(6):579–87. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15659012/>.
193. Slack JMW. *The science of stem cells*. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell; 2018.
194. Werner L, Deutsch V, Barshack I, Miller H, Keren G, George J. Transfer of endothelial progenitor cells improves myocardial performance in rats with dilated cardiomyopathy induced following experimental myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39(4):691–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.06.015.
195. Sheu J-J, Hsiao H-Y, Chung S-Y, Chua S, Chen K-H, Sung P-H et al. Endothelial progenitor cells, rosuvastatin and valsartan have a comparable effect on repair of balloon-denudated carotid artery injury. *Am J Transl Res* 2019; 11(3):1282–98.
196. Rolstad B. The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? *Immunol Rev* 2001; 184:136–44. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1840113.x.
197. Liu C, Sun Z, Du X, Chen X, Feng J, Jia B. Implantation of endothelial progenitor cells into laser-induced channels in rat ischemia hindlimb augments neovascularization. *Ann Vasc Surg* 2005; 19(2):241–7. doi: 10.1007/s10016-004-0173-8.
198. Ladhoff J, Fleischer B, Hara Y, Volk H-D, Seifert M. Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2010; 88(1):121–9. doi: 10.1093/cvr/cvq109.
199. Lee SH, Ra JC, Oh HJ, Kim MJ, Setyawan EMN, Choi YB et al. Clinical Assessment of Intravenous Endothelial Progenitor Cell Transplantation in Dogs. *Cell Transplant* 2019; 28(7):943–54. doi: 10.1177/0963689718821686.
200. Kwon YW, Heo SC, Lee TW, Park GT, Yoon JW, Jang IH et al. N-Acetylated Proline-Glycine-Proline Accelerates Cutaneous Wound Healing and Neovascularization by Human Endothelial Progenitor Cells. *Sci Rep* 2017; 7:43057. doi: 10.1038/srep43057.
201. Hu C, Ke X, Chen K, Yang D, Du Z, Wu G. Transplantation of human umbilical cord-derived endothelial progenitor cells promotes re-endothelialization of the injured carotid artery after balloon injury in New Zealand white rabbits. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(8):1480–5.
202. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999; 77(6):499–508. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x.
203. Lara-Hernandez R, Lozano-Vilardell P, Blanes P, Torreguitart-Mirada N, Galmés A, Besalduch J. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg* 2010; 24(2):287–94. doi: 10.1016/j.avsg.2009.10.012.
204. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH et al. Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* 2008; 12(6):650–5. doi: 10.1111/j.1399-3046.2007.00863.x.
205. D'Avola D, Fernández-Ruiz V, Carmona-Torre F, Méndez M, Pérez-Calvo J, Prósper F et al. Phase 1-2 pilot clinical trial in patients with decompensated liver cirrhosis treated with bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Transl Res* 2017; 188:80-91.e2. doi: 10.1016/j.trsl.2016.02.009.

206. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C et al. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. *Cell Transplant* 2014; 23(2):167–79. doi: 10.3727/096368912X658007.
207. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(5):1316–20. doi: 10.1002/sctm.16-0360.
208. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz): TPG; 1997.
209. Fortier LA, Travis AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2(1):9. doi: 10.1186/srct50.
210. Markoski MM. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. *Scientifica (Cairo)* 2016; 2016:4516920. doi: 10.1155/2016/4516920.
211. European Medicines Agency. Zulassung Arti-Cell Forte; 2019. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/arti-cell-forte>.
212. Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. *Front Vet Sci* 2020; 7:278. doi: 10.3389/fvets.2020.00278.
213. Wu H, Riha GM, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of surgical research* 2005; 126(2):193–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15919419/>.
214. Dong-In Jung, Jeongim Ha, Ju-Won Kim, Byeong-Teck Kang, Jong-Hyun Yoo, Chul Park et al. Canine Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow: Isolation, Characterization, Multidifferentiation, and Neurotrophic Factor Expression in vitro. *JOURNAL OF VETERINARY CLINICS* 2008; 25(6):458–65. Verfügbar unter: https://ocean.kisti.re.kr/IS_mvpopo213L.do?ResultTotalCNT=26&pageNo=1&pageSize=10&method=eview&poid=ksvcm&kojic=OSSOB1&sVnc=v25n6&id=4&setId=&iTableId=&iDocId=&sFree=&pQuery=%28kojic%3AOSSOB1%29+AND+%28voliss_ctrl_no%3Av25n6%29.
215. Chen C, Dai P, Nan L, Lu R, Wang X, Tian Y et al. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from canine bone marrow. *Biotech Histochem* 2020;1–9. doi: 10.1080/10520295.2020.1762001.
216. Chen C, Zheng S, Zhang X, Dai P, Gao Y, Nan L et al. Transplantation of Amniotic Scaffold-Seeded Mesenchymal Stem Cells and/or Endothelial Progenitor Cells From Bone Marrow to Efficiently Repair 3-cm Circumferential Urethral Defect in Model Dogs. *Tissue Eng Part A* 2018; 24(1-2):47–56. doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0518.

11 Anhang

11.1 HE-Färbung

Die Gewebsschnitte wurden zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zunächst dreimal für jeweils 10 Minuten in Xylol (Merck KGaA, Darmstadt), danach jeweils zweimal für fünf Minuten in Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt) 98 %, 96 % und 80 %. Nach Spülen mit destilliertem Wasser (Merck KGaA, Darmstadt), wurden sie für weitere zehn Minuten mit Hämatoxylin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) nach Mayer gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten in Leitungswasser gebläut und danach fünf Minuten in Eosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) gefärbt. Nach erneuter Spülung mit destilliertem Wasser folgte eine Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Einmalig in 80 %, zweimalig in 96 % und abschließend zweimalig für jeweils 5 Minuten in 98 % Isopropanol. Zuletzt wurden die Proben dreimalig für jeweils 5 Minuten in Xylol fixiert und mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt.

11.2 CD 31-Immunhistochemie

Wie oben beschrieben wurden die Schnitte nach dem Einbetten zunächst in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Um die durch die Fixierung entstandene Maskierung der Epitope aufzuheben, wurden die Schnitte 45 Minuten lang mit einer *target-retrieval*-Lösung (K800421-2, Dako GmbH, Hamburg,) inkubiert. Nach Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus IgG Anti-Ratte CD31, MCA1334G, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) über 60 Minuten in einer Verdünnung von 1:100 (Antibody diluent S2022, Dako GmbH, Hamburg). Nach Spülung in Pufferlösung erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG, BA 2001, Vector Laboratories, Inc., Burlingame) in einer Verdünnung von 1:200 über 30 Minuten. Nach erneuter Spülung mit Pufferlösung wurden die Proben für 30 Minuten mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain PK 6100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame) behandelt. Avidin bindet an die Bindungsstellen des Biotins, welches im sekundären Antikörper vorliegt und geht mit ihm eine sehr stabile Bindung ein. Im Anschluss wurde Diaminobenzidin (Diaminobenzidin plus K3468, Dako GmbH, Hamburg) zugegeben, welches als Substrat für die Peroxidase dient und dadurch die Aktivierung des Chromogens katalysiert. Die entstehende braune Farbreaktion wurde mikroskopisch kontrolliert und dann eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Nach Bläuen unter Leitungswasser für zehn Minuten wurden die Schnitte in Alkohol entwässert und eingedeckt.

11.3 PCNA

Die Schnitte wurden wie oben beschrieben entparaffiniert. Um die Epitope zu demaskieren, erfolgte eine Behandlung mit einer *Peroxidase-blocking-solution* (Peroxidase-Blocking Solution S202398-2,

Dako GmbH, Hamburg). Anschließend wurden die Schnitte mit einem Primärantikörper (Maus Anti-Ratte PCNA, PC10, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in einer Verdünnung von 1:300 mit 10 % BSA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus IgG, STAR117D488GA Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in einer Verdünnung von 1:500. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiter verfahren (ABC-Methode und Einsatz von DAB).

12 Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pabst AM*, Jäger L*, Ackermann M, Konerding MA. Modified free pectoral skin flaps in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Nov;53(9):891-3.

Pabst AM, Kämmerer PW, Krüger M, Jäger L, Ackermann M. Vascular architecture in free flaps: Analysis of vessel morphology and morphometry in murine free flaps. *Microvasc Res*. 2018 Jul;118:128-136.

*Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Veröffentlichung bei.

13 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Moritz A. Konerding für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Maximilian Ackermann für die Übernahme der Betreuung nach dem Tod von Prof. Konerding. Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Pabst für die Betreuung der Versuche.

Herrn Professor Dr. med. vet. Dr. h.c. (Bursa) Dr. h.c. (Torun) Martin Kramer danke ich für die veterinärmedizinische Betreuung der Arbeit.

Frau Kerstin Bahr danke ich für die kompetente Durchführung der Probenbearbeitung und der technischen Unterstützung während der Experimente.

Diese Studie wurde ermöglicht durch Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Mein weiterer Dank gilt meiner Frau und meiner Familie für ihre Unterstützung.

14 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lukas Jäger



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7135-6



9 783835 971356