

Aus der Klinik für Plastische und Handchirurgie
Zentrum für Schwerbrandverletzte
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. P. Mailänder

**Monitoring biochemischer und immunologischer Veränderungen
in freien mikrovaskulären Gewebetransplantaten mit Hilfe der
Mikrodialysetechnik**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -



vorgelegt von
Anne Brüggemann
aus Stralsund

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-G. Machens
 2. Berichterstatter: PD Dr. med. J. Gliemroth
- Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2007

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Freie myokutane Lappen.....	1
1.2. Mikrodialysetechnik.....	3
1.3. Untersuchte metabolische Parameter.....	5
1.4. C3a	7
1.5. Interleukin-8.....	9
1.6. RANTES.....	10
1.7. Fragestellung.....	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Patientendaten	12
2.2. Operatives Vorgehen.....	14
2.2.1. Transplantation des Musculus latissimus dorsi	17
2.2.2. Transplantation des Radialislappen	18
2.2.3. Mikrodialysetechnik	19
2.3. CMA-Analyse	20
2.4. Enzymimmunoassay.....	21
2.4.1. C3a.....	23
2.4.2. Interleukin-8	24
2.4.3. RANTES.....	24
2.5. Statistik.....	25
2.6. Allgemeine Berechnung und graphische Darstellung.....	25
3. Ergebnisse	28
3.1. Patientendaten	28
3.2. Operationsdaten	31
3.3. Metabolische Parameter	32

3.3.1. Glukose	32
3.3.2. Laktat	33
3.3.3. Pyruvat.....	35
3.3.4. Quotient Laktat / Pyruvat.....	36
3.3.5. Glyzerol	37
3.4. Immunologische Parameter	39
3.4.1. C3a.....	39
3.4.2. Interleukin-8	40
3.4.3. RANTES.....	41
4. Diskussion.....	42
4.1. Die Mikrodialysetechnik.....	42
4.2. Metabolische Parameter	45
4.2.1. Glukose	46
4.2.2. Laktat	47
4.2.3. Pyruvat.....	48
4.2.4. Quotient Laktat / Pyruvat.....	48
4.2.5. Glyzerol	49
4.3. Immunologische Parameter	51
4.3.1. C3a.....	51
4.3.2. Interleukin-8	54
4.3.3. RANTES.....	55
4.4. Ischämie-Reperfusionsvorgang.....	56
4.5. Klinische Relevanz	58
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	62
7. Danksagung.....	71
8. Lebenslauf	72
9. Publikationen	73

1. Einleitung

1.1. Freie myokutane Lappen

Die chirurgische Behandlung von ausgeprägten Defekten der Körperoberfläche stellt eine besondere Herausforderung für die operative Plastische Chirurgie dar. Um das bestmögliche Behandlungskonzept zu finden, müssen patientenspezifische Faktoren, Defektgenese, -lokalisierung, -ausdehnung, zu rekonstruierende Strukturen und mögliche Kontamination des Defekts berücksichtigt werden [44]. Freiliegende Nerven, Sehnen, Knochenanteile und Fettgewebe verbieten die Transplantation von nicht primär vaskularisierten Hauttransplantaten. Auch über Gelenkregionen sind Spalt- oder Vollhauttransplantate nachteilig, da sie häufiger zu Narbensträngen führen und somit die Beweglichkeit stark einschränken können. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass bei Verletzungen der oberen Extremität eine sensible Defektdeckung mit maximaler Bewegungsfreiheit entscheidend ist, während die Versorgung der unteren Extremität vor allem der mechanischen Beanspruchung gerecht werden sollte [115, 146].

Hier eignen sich freie oder lokale myokutane Gewebe, die unabhängig von der Durchblutung des umgebenden Gewebes sind und primär ihre eigene Gefäßversorgung mitbringen. Der Begriff Transplantation beschreibt eine Übertragung von Organen, Zellen oder Geweben zwischen zwei, durch Gewebe voneinander vollständig getrennte Körperbereiche. In Indien wurden bereits 600 v. Chr. Nasenrekonstruktionen aus Gewebe des Oberarmes notwendig, da Bestrafungen von Kriminellen in dieser Zeit häufig durch Amputation der Nase stattfanden. Ähnliche „Operationen“ sind auch aus Ägypten und China beschrieben. Diese Operationen hatten jedoch den Nachteil, dass die transplantierten Gewebe allein von der Durchblutung der umgebenden Gewebestrukturen abhängig waren. Das anatomische Wissen der Chirurgen begrenzte sich lange Zeit auf die Stamm- und Hauptgefäße der Muskulatur. Erst 1889 beschrieben Carl Manchot und 1936 Michel Salmon detaillierte mikrozirkulatorische Erkenntnisse über kutane, subkutane und transmuskuläre Gefäßversorgungen [88, 126].

Als einer der wichtigsten Wegbereiter der chirurgischen Transplantationen im Sinne primär vaskularisierter Transplantate gilt Alexis Carrel (1873-1944). Er beschrieb 1902 die Verbindung zweier Blutgefäße mit feiner Seide in einer einreihig fortlaufenden Naht (Carrel'sche Naht). 1908 entdeckte er in Zusammenarbeit mit Charles Claude Guthrie (1880-1963), dass der Organstoffwechsel durch eine künstliche Hypothermie vermindert werden kann und das transplantierte Gewebe somit länger zu konservieren ist. Zusammen verfassten

sie die Schrift „*The transplantation of veins and organs*“, welche allgemein als Grundlage der Gefäß- und Transplantationschirurgie angesehen wird [22].

Ende des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich der italienische Professor Inguino Tansini mit den ungünstigen ästhetischen und funktionellen Folgezuständen nach Mastektomie. 1896 veröffentlichte er Ergebnisse seiner Forschung mit Rückenhautlappen in der Fachzeitschrift *Riforma Medica*. Die distalen Anteile des Lappens wiesen dabei ständig Nekrosezonen auf und er untersuchte im anatomischen Institut zu Padua die morphologischen Besonderheiten dieser Region. Dabei erkannte er die Bedeutung der Arteriae perforantes, die die Blutversorgung des Muskels und der darüber befindlichen Haut sichern. Daraus entwickelte er eine Lappenplastik, die nicht nur die Haut, sondern auch einen großen Anteil der darunterliegenden Muskelschicht umfasste [91]. Das große Potential der Lappentransplantation wurde zu jener Zeit jedoch nicht hinreichend erkannt und die Wundversorgung mit Lappentransplantaten in den Hintergrund gedrängt. Man griff auf einen einfachen Wundverschluß mit Hauttransplantaten zurück. Erst 1939 wurde die Latissimus-Dorsi-Lappentransplantation wieder aktuell. Hutchins benutzte diese Methode, um freiliegende Gefäße nach Axillausräumung zu decken und Lymphödeme durch die gute Durchblutung dieses Muskels zu verhindern [60]. Wiederum geriet die Lappentransplantation in Vergessenheit. Erst 1976 untersuchte Olivari erneut den Musculus latissimus dorsi (LD) und erkannte seine Vielseitigkeit und die Problemlösbarkeit, mit der dieser Lappen gehoben und auf die verschiedensten Gebiete transferiert werden konnte [107].

Die Verbesserung der chirurgischen Nahttechniken und die Verfeinerung der Mikrochirurgie bedeuteten weitere entscheidende Fortschritte in der Verwendung des LD-Lappens. 1978 wurde zum ersten Mal durch Maxwell et al. Ergebnisse nach Transplantationen freier LD - Lappen veröffentlicht [90]. Seither konnte die Verwendung der freien myokutanen Latissimus dorsi Lappen (FMLD) verbessert und optimiert werden und gilt als eine der Standardmethoden für die Deckung großer und problematischer Weichteildefekte im Bereich des Kopfes, des Oberkörpers und der oberen Extremität. Hauptsächlich wird der FMLD jedoch zur plastischen Deckung freiliegender Strukturen und ausgedehnter Weichteildefekte der unteren Extremität genutzt [115]. Die LD-Hebung und Anastomosierung in das Empfängerareal konnte in den letzten Jahren deutlich verbessert und so die Ergebnisse optimiert und die Zufriedenheit der Patienten erhöht werden [104, 125]. Zwischenzeitlich wurde die endoskopische LD-Lappenhebung besonders bei der Weichteilwundversorgung von jungen Kindern wegen kleinerer Hebedefektwunden eingesetzt [128]. Jedoch handelt es sich um ein zeitaufwendiges und technisch schwieriges Verfahren, dessen Vorteile nicht

bestätigt werden konnten. Eine ebenfalls mögliche und vor allem bei einem Weichteiltrauma mit zusätzlichem Knochenverlust sinnvolle Methode ist die LD-Lappenplastik mit Anteilen der Scapula [2].

Der Radialislappen wird auch als “Chinese forearm flap” bezeichnet und kann sowohl als freies Lappentransplantat oder Insellappen verwendet werden. Aufgrund des relativ großen Gefäßdurchmessers können vaskuläre Anschlüsse gut anastomosiert werden [89]. Darüber hinaus zeichnet sich der Radialislappen durch seine Vielseitigkeit aus. Denn neben seiner Verwendung als reiner muskulärer Lappen kann er auch in Kombination mit Faszien, Sehnen- und Knochenanteilen sowie Nerven zum Einsatz kommen [14, 98, 103].

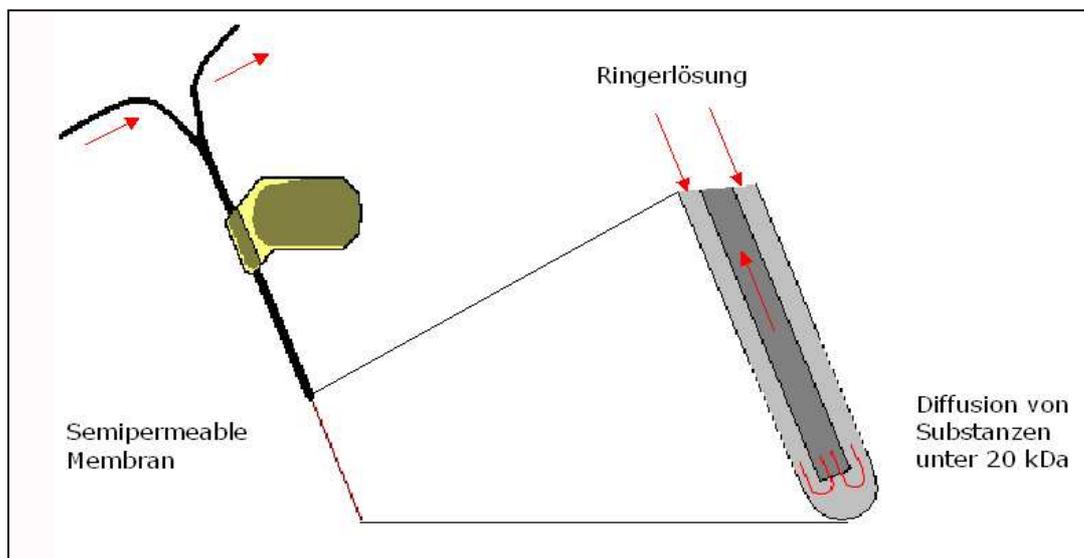
Die Verwendung freier myokutaner Lappen zur Therapie größerer Gewebedefekte ist zunehmend zur Routine geworden. Entsprechend hat sich auch das wissenschaftliche Interesse von primär klinischen Aspekten wie Operationstechniken und Methode zur Sicherung desselben wie postoperatives Monitoring der Durchblutung hin zu grundlagenwissenschaftlichen Fragen gewendet. War es früher die Frage nach dem Überleben des Lappens, so richtet sich heute das Interesse auf die pathophysiologischen Vorgänge vor, während und nach dem Gefäßanschluß. Entsprechend weicht zunehmend die Aufmerksamkeit an einem reinen Monitoring der Durchblutung einem Interesse an den biochemischen und immunologischen Veränderungen nach freier Lappengewebetransplantation. Es wird zunehmend klar, dass die Transplantation eines FMLD ein besonderes, weil elektives und autologes Transplantationsmodell in der Klinik darstellt, mit dem Ischämie-Reperfusionsvorgänge gezielt analysiert werden können.

1.2. Mikrodialysetechnik

Um pathophysiologische Vorgänge in den verschiedensten Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen verstehen und analysieren zu können, müssen Konzentrationsänderungen und Stoffwechselveränderungen direkt und lokal messbar sein. 1966 wurde erstmals durch Bito et al. [12] eine Technik beschrieben, mit der *in vivo* Proben aus dem interstitiellen Gewebe gewonnen werden konnten. Ein mit einer Zucker-Elektrolyt-Lösung gefüllter „Dialysesack“ wurde in das subkutane Gewebe implantiert und dort mehrere Wochen belassen. Er wurde später entfernt und anschließend auf die Konzentrationen von Aminosäuren hin untersucht. Eine Weiterentwicklung präsentierte Delgado et al. 1972 [30]. Sie erfanden eine Kanüle, die in einer Dialysemembran endete und überwachten so die intrazerebrale Perfusion bei Affen. Um darüber hinaus schnellere und fortlaufende Ergebnisse über Neurotransmitterkonzentrationen im Hirn zu erhalten, entwickelte Ungerstedt einen

Katheter, der die Funktion einer Blutkapillare nachahmen sollte [140]. Nach Einbringen des Katheters in das zu untersuchende Hirngewebe wurde das Kathetersystem mit einer Perfusionsflüssigkeit durchspült und so eine Äquilibration mit der Umgebung hergestellt. Da die Perfusionsflüssigkeit mit standardisierter Elektrolytlösung in einer festgelegten Geschwindigkeit das Kathetersystem durchfloss, wiesen alle abweichenden Substanzkonzentrationen auf eine Veränderung der Stoffwechselprozesse im umgebenden Gewebe hin. Auf diese Weise konnten bereits zahlreiche Daten über pathophysiologische Vorgänge im Hirn analysiert werden [53, 63]. Durch die Mikro dialyse konnten metabolische Vorgänge und ischämische Situationen in vielen verschiedenen Gewebearten erforscht werden. Besonders in der Neurochirurgie hat sich die Monitoringmethode bereits klinisch etabliert [105, 112]. Während zu Beginn der Entwicklung die Mikro dialysetechnik vorwiegend im Bereich der Neurowissenschaften angewandt wurde, kann man sie heutzutage in fast allen medizinischen Bereichen finden. Die Mikro dialysetechnik hat sich somit sowohl zu einem anerkannten diagnostischen Mittel im Klinikalltag als auch zu einem wertvollen Instrument in der medizinischen Forschung entwickelt.

Abbildung 1: Katheteraufbau



Die Technik der Mikro dialyse besteht grundlegend aus einer Mikro dialysepumpe, einem Kathetersystem, einem Sammelbehälter (Microvial) und einem Analysegerät. Sie beruht auf dem Prinzip der Diffusion von Substanzen aus der Extrazellulärflüssigkeit in den Katheterinnere. Eine Perfusionsflüssigkeit wird mit einer konstanten Geschwindigkeit entlang einer semipermeablen Membran geleitet. Hier kommt es zu einem Übertreten von Stoffen in Richtung des Konzentrationsgefälles. Nachdem die Diffusionsflüssigkeit die Katheterspitze

erreicht hat, wird sie in das Katheterinnere geleitet (Abbildung 1). Hier kann also keine weitere Veränderung der Substanzkonzentration mehr stattfinden. Dieses Prinzip ermöglicht das Monitoring von Konzentrationsänderungen der unterschiedlichen Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten.

1.3. Untersuchte metabolische Parameter

Perfusion, Ischämie und Reperfusion können direkt über eine Darstellung des Blutflusses beispielsweise in Form von Doppler-Sonografie, Photoplethysmografie, mit Hilfe des Fluoreszein-Tests oder der Hydrogen-Clearance-Technik [86] gemessen werden. Indirekt erlaubt die Messung von metabolischen Substanzen eine Aussage über die Energieversorgung und – umsetzung im Gewebe.

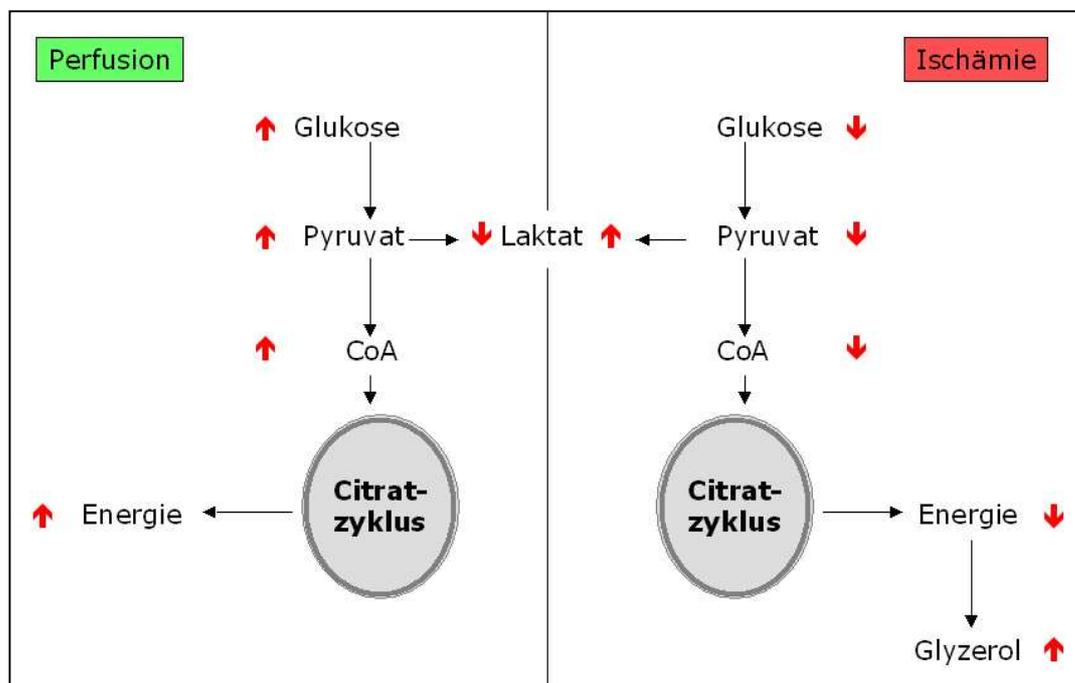
Die Umwandlung von Glukose in Pyruvat wird als Glykolyse bezeichnet. Diese Reaktionskette kann in drei Abschnitte eingeteilt werden. Im ersten Abschnitt wird Glukose phosphoryliert, isomerisiert und erneut phosphoryliert. Im zweiten Abschnitt wird das entstandene Fructose-1,6-bisphosphat durch eine Aldolase gespalten, anschließend oxidiert und erneut phosphoryliert. Im letzten Abschnitt wird nun unter Wasserabspaltung und Umlagerung einer Phosphorylgruppe Phosphoenolpyruvat gebildet. Dieses Zwischenprodukt wird schließlich in Pyruvat verwandelt. Insgesamt entstehen bei der Umwandlung aus einem Molekül Glukose zwei Moleküle Pyruvat. Dabei werden zwei Moleküle ATP frei. Pyruvat kann auf dreierlei Weise weiterverwertet werden (Tabelle 1). Hefen und andere Mikroorganismen wandeln Pyruvat über das Zwischenprodukt Acetaldehyd in Ethanol um. Dies bezeichnet man auch als alkoholische Gärung. In höheren Organismen wird bei einem Mangel an Sauerstoff Pyruvat in Laktat umgewandelt. Diese Verarbeitung von Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase katalysiert. Beide Reaktionen stellen keine Oxidations-Reduktions-Reaktionen dar, da das entstehende NAD während der Reaktionen wieder zu NADH regeneriert wird. Letztlich wird dennoch nur ein kleiner Teil der Energie aus dem anaeroben Glukoseabbau gewonnen. Der weitaus größte Teil entsteht aus der Atmungskette und dem Citratzyklus. Hierbei wird Pyruvat in den Mitochondrien zu Acetyl-Coenzym A (CoA) umgewandelt.

Tabelle 1: Pyruvatumwandlung

Bedingung	Energie	Formel
Mikroorganismen, Hefen	- 226 kJ/mol	$\text{Pyruvat} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{CO}_2$ $\text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Ethanol} + \text{NAD}^+$
Höhere Organismen, anaerob	- 197 kJ/mol	$\text{Glukose} + 2\text{P}_i + 2\text{ADP} \rightarrow 2\text{Laktat} + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$
Höhere Organismen, aerob	-2881 kJ/mol	$\text{Pyruvat} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Pyruvat und Glycerol gemessen. Wie in Abbildung 2 gezeigt, wird während der Perfusion das Gewebe ausreichend mit Glukose versorgt und im Stoffwechsel zu Pyruvat umgewandelt. Dieses wird zu einem kleinen Teil zu Laktat verstoffwechselt, während der weitaus größere Anteil über CoA in den Zitratzyklus gelangt und dort für die ATP-Produktion zur Verfügung steht. Folglich findet sich während der normalen Perfusion eines Gewebes eine ausreichende Glukosekonzentration und ein niedriger Laktat-Pyruvat-Quotient.

Abbildung 2: Die Konzentrationsänderung metabolischer Parameter während Ischämie und Perfusion



Wird ein Gewebe minderperfundiert oder ist ischämisch, so ist auch die Glukosekonzentration vermindert. Das gewonnene Pyruvat wird unter diesen Umständen in großen Anteilen zu Laktat umgewandelt, da keine Energie für den Zitratzyklus zur Verfügung steht. Folglich

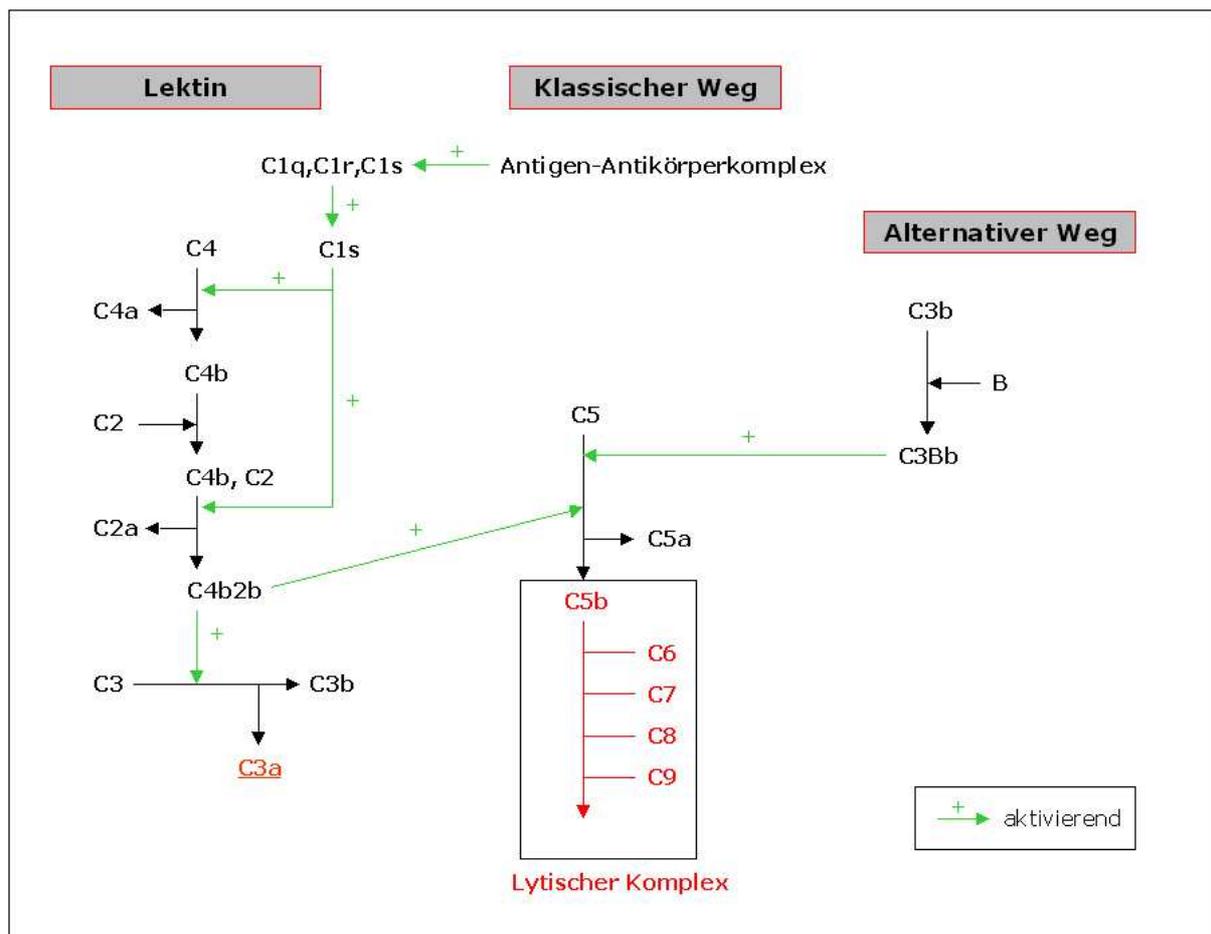
erhöht sich der Laktat-Pyruvat-Quotient und die Zellen des minderperfundierten Gewebes werden abhängig von einer anaeroben ATP-Produktion. Dies allerdings mündet in einer verminderten Zellfunktion oder – bei längerer Minderperfusion oder Ischämie – in einen Zellularuntergang. Diese Situation wiederum führt zu einer erhöhten Glycerolkonzentration, da diese Substanz ein Bestandteil der Zellmembran ist und bei einer hypoxisch bedingten Zellyse frei wird.

1.4. C3a

Das Komplementsystem ist ein potentes Abwehrsystem gegen Mikroorganismen und membrangebundene Pathogene (Abbildung 3). Darüber hinaus wird das System durch Entzündungsreaktionen, Traumen und Ischämie-Reperfusionvorgänge aktiviert [96]. C3 ist die dritte Komponente des Komplementsystems. Es hat eine Größe von 187,163 Kilodalton (kDa) und besteht aus 1663 Aminosäuren. C3 besitzt Ähnlichkeiten zu anderen Komplementfaktoren wie C4, C5 und Alpha-2-Makroglobulin. Das Gen für C3 ist auf dem kleinen Arm von Chromosom 19 lokalisiert. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Formen bekannt: C3s (C3slow) und C3f (C3fast), wobei C3s bei allen menschlichen Völkern anzutreffen ist und C3f vornehmlich bei Kaukasiern, weniger häufig bei schwarzen Amerikanern und selten bei orientalischen Völkern.

C3 wird über eine selektive Proteolyse auf direktem und indirektem, sowie über den Lektin-Weg aktiviert. Klassisch werden zuerst C1 und C2 aktiviert, von C4 ein 4arg-Anteil abgespalten und so zwei Anteile freigelegt. C2b und C4b lagern sich zusammen und bilden nun eine C3-Konvertase. Der alternative Weg ist gekennzeichnet durch einen spontanen bzw. schnellen Zerfall von C3 in C3a und C3b. C3a wirkt als Anaphylatoxin, C3b bindet an Zelloberflächen. Handelt es sich um eine körpereigene Zelle, wird es rasch inaktiviert. Auf pathogenen Oberflächen bleibt es aktiv und bindet Faktor B und wird so zum C3bB-Komplex. Durch Abspaltung von Ba verändert sich der Komplex zu C3bBb und wird nun als „C3-Konvertase des alternativen Weges“ bezeichnet. Der Lektin-Weg ist gekennzeichnet durch die Bindung von Lektin (MBL) an Mannose oder N-Acetyl-Glukosamin auf pathogenen Zelloberflächen. Dadurch werden die Proteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3 aktiviert, die die gleichen Reaktionen wie auf dem klassischen Weg hervorrufen. Auch hier bilden wieder C2b und C4b einen Komplex und damit ebenfalls die C3-Konvertase. Die C3-Konvertase kann also in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen, C3bBb und C4bC2b, und spaltet mit hoher Aktivität C3 in C3a und C3b.

Abbildung 3: Das Komplementsystem (nach Löffler, Basiswissen Biochemie, Springer-Verlag)



C3a besteht aus 77 Aminosäuren bei einer Größe von 9,3 kDa. Es wird aufgebaut aus einer einzelnen Kette, die einen 8-prozentigen Zysteinanteil und eine endständige kationische COOH-Region aufweist. Eben dieser endständige Anteil ist aller Wahrscheinlichkeit nach verantwortlich für die Interaktionen zwischen C3a und zellulären Rezeptoren. Die Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und an Granulozyten, Monozyten und Mastzellen zu finden, sowie auf aktivierten Lymphozyten und nervalem Gewebe [59, 130]. C3a – auch C3a Anaphylatoxin genannt – spielt eine wichtige Rolle bei lokalen Entzündungsprozessen [137]. Es führt zur Kontraktion von glatten Muskelzellen, erhöht die Gefäßpermeabilität und steigert die Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten und Mastzellen. Zudem moduliert C3a die Zytokinproduktion. Im Wesentlichen soll C3a dabei die Produktion von Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) von ortsständigen Monozyten erhöhen und die Produktion dieser Stoffe durch zirkulierende Zellen vermindern [136]. C3a stellt somit einen nicht unwesentlichen Faktor des inflammatorischen Systems dar, der sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirkt [67]. Außerdem besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit eine

Verbindung zum blutbildenden System. So konnte beobachtet werden, dass C3 durch das Knochenmark in C3a und C3b aktiviert wird und hämatopoetische Zellen (hematopoietic stem/progenitor cells = HSPC) retiniert werden können [117]. C3a-Rezeptoren können vor allem an der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten gefunden werden und spielen daher möglicherweise eine Rolle bei T-Zell-vermittelten Krankheiten, wie beispielsweise atopische Hautreaktionen, Vaskulitiden oder Autoimmunerkrankungen (Myasthenia gravis, Hashimoto-Thyreoiditis) [145].

1.5. Interleukin-8

Die Hauptform des Interleukin-8 (Il-8) ist ein Protein mit einer Größe von 8 kDa bestehend aus 72 Aminosäuren. Es wird aus einem 99-Aminosäuren langen Präkursor durch Abspaltung verschiedener Sequenzen gebildet, wobei unterschiedliche Formen des Il-8 entstehen können. Das veränderte AVLPR-Il-8 ist ein um 5 Aminosäuren verlängertes Il-8-Molekül und identisch mit FDNCF (fibroblast-derived neutrophil chemotactic factor). Die biologischen Eigenschaften von Il-8 ähneln sehr stark denen des NAP-2 (neutrophil-activating peptide 2) [7].

Das Gen für Il-8 hat eine Länge von 5,1 Kilobasen (kb) und konnte auf dem langen Arm von Chromosom 4 lokalisiert werden. Die Il-8-Synthese wird durch Interleukin-1 und den Tumornekrosefaktor- α stimuliert und beispielsweise durch Glukokortikoide und Interleukin-10 gehemmt. Die Il-8 kodierenden Genabschnitte werden reguliert durch den Nuklear Faktor KappaB, welcher seinerseits durch Glukokortikoide gehemmt werden kann [111]. Auch Alpha 2-Makroglobulin scheint einen Einfluss auf die Il-8-Funktion speziell in Lungengewebe zu haben [74]. Die Wirkung entfaltet sich über CXCR1 und CXCR2, zwei Rezeptoren aus der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie [111]. Interleukin-8 wird von stimulierten Monozyten, nicht-gewebeständigen Makrophagen und anderen Zellen (auch einigen malignen Zellreihen) produziert [7, 142]. Il-8 wirkt im Gegensatz zu anderen Chemokinen spezifisch aktivierend auf neutrophile Granulozyten und hat nur eine geringe Einwirkung auf basophile und eosinophile Granulozyten. Dabei führt Il-8 zu einer vorübergehenden Kalziumkonzentrationserhöhung, was wiederum eine Freisetzung verschiedener Enzyme aus den Granula nach sich zieht [7]. Bei alleiniger Wirkung von Il-8 werden so Leukotriene freigesetzt, während es bei einer Kostimulation mit Interleukin-3 zu einer additiven Ausschüttung von Histamin kommt. Zusätzlich wird der Umsatz von reaktiven Sauerstoffradikalen erhöht und Adhäsionsmoleküle vermehrt exprimiert. Die Chemotaxis von

neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie T-Zellen wird angeregt, wobei gleichzeitig die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen verhindert wird.

Interleukin-8 wird mit dem Wachstum und der Angiogenese verschiedener Tumorarten in Verbindung gebracht [147]. So stimuliert Il-8 den Androgenrezeptor und verändert so das androgenvermittelte Wachstum von Prostatacarcinomen und die Sekretion des Prostata-spezifischen-Antigens. Die Wirkung von Il-8 wird über die Tyrosinkinase Src und FAK vermittelt. Dabei werden Wachstum und Zellmigration der Carcinomzellen über Src und die alleinige Zellmigration über FAK gesteuert [79].

1.6. RANTES

Der Faktor RANTES (**r**egulated upon **a**ctivation, **n**ormal **T** expressed, and presumably secreted) hat eine Länge von 68 Aminosäuren und zählt zu den CC-Chemokinen [4]. Das zugehörige Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17. Die genauen Wirkmechanismen und Aufgaben von RANTES konnten bisher nicht identifiziert werden – Arbeiten aus unterschiedlichen medizinischen und physiologischen Bereichen lassen dennoch den Schluss zu, dass RANTES an einer Vielzahl von immunologischen Prozessen beteiligt ist. So lassen sich erhöhte RANTES-Konzentrationen zum Beispiel bei Hitzeschlägen [83] und allergischen Reaktionen [143] finden. Etwa 4-12 Stunden nach Allergenexposition kommt es zu einer Hochregulierung der RANTES-Konzentration [39]. Die schnelle Bereitstellung von RANTES wird durch die Verarbeitung bereits existierender mRNA in CD8-Gedächtnis-T-Zellen ermöglicht [135].

RANTES wird nach Stimulation durch TNF- α oder Interferon (IFN)-gamma produziert [56], bindet an verschiedene Rezeptoren (CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR4, CCR-5) und wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Helfer-Zellen, basophile Granulozyten und Mastzellen. Zusätzlich wird die Freisetzung von Histamin aus eosinophilen Granulozyten angeregt. CD40 positive T-Zellen binden an Thrombozyten und führen auf diese Weise ebenfalls zu einer Freisetzung von RANTES. Sogar in humanen Spermienzellen ist mRNA für CCR-1 und CCR-5 vorhanden und RANTES scheint einen Einfluss auf die Chemotaxis von Spermien im weiblichen Organismus zu haben [62]. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich bei RANTES darüber hinaus um einen Faktor, der auf HIV 1 und HIV 2 (human immunodeficiency virus), sowie SIV (simian immunodeficiency virus) supprimierend wirkt [4].

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass RANTES eine wichtige und bisher noch wenig erforschte Rolle bei vielen Vorgängen im menschlichen Körper spielt und in ein kompliziertes Netzwerk von Signalwegen integriert ist.

1.7. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, den Zusammenhang zwischen Ischämiedauer und Reperfusionsschäden zu erforschen. Es gilt herauszufinden, ob metabolische und immunologische Parameter mittels der Mikrodialysetechnik zu detektieren sind und ob deren Konzentrationen mit einer Verlängerung oder Verkürzung der Ischämiedauer korrelieren. Ferner gilt es zu überprüfen, ob die Mikrodialysetechnik als Monitoringtechnik bei freien myokutanen Lappentransplantationen geeignet ist. Bisher wurden für solche Fragestellungen allein Laktat, Pyruvat und Glukose, selten auch Glyzerol verwendet. In dieser Arbeit soll erstmalig auch ein Monitoring der eingangs dargestellten immunologischen Parameter erfolgen. Diese Parameter können auf Grund ihrer kleinen molekularen Struktur (<20 kDa) mit Hilfe des Mikrodialyseverfahren gemessen werden.

Folgende definierte Fragestellungen sollen also im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Stellt die Mikrodialysetechnik ein geeignetes Monitoringverfahren für die postoperative Überwachung bei freien myokutanen Lappentransplantationen dar?
2. Verändern sich die Konzentrationen von metabolischen Parametern wie Glukose, Laktat, Pyruvat und Glyzerol in Abhängigkeit von der Ischämiedauer?
3. Kann die Ischämiedauer die Konzentrationen von immunologischen Parametern wie Interleukin-8, RANTES und C3a beeinflussen?
4. Bieten sich durch die gewonnenen Ergebnisse neue Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens?

2. Material und Methoden

2.1. Patientendaten

In der Zeit von Januar 2002 bis August 2003 wurden in der Plastischen Chirurgie 21 Patienten mit einem freien myokutanen Latissimus dorsi Lappen (FMLD) versorgt und ein Patient mit einem Radialislappen (R). 19 Patienten stimmten im Vorfeld der Überwachung mittels der MDT schriftlich zu, Grundlage war der Ethikantrag 99-012. Das Patientenkollektiv bestand aus achtzehn männlichen und einer weiblichen Person, die entweder primär direkt in der Klinik behandelt oder durch eine andere behandelnde Klinik überwiesen worden waren. Das Alter lag zwischen 17 und 58 Jahren (Tabelle 3). Achtzehn Patienten hatten Weichteilgewebedefekte aufgrund eines Unfalltraumas. Ein Patient wurde mit einem FMLD versorgt, da sich nach einem Primärunfall 1989 eine chronische Osteomyelitis in der betroffenen Extremität entwickelte. Die Art der Verletzung konnte in vier verschiedene Gruppen mit weiteren Untergruppen eingeteilt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Unfallarten

Gruppe	Unfallart	Patienten
A	Arbeitsunfall	2
B	Verkehrsunfall 1. PKW	4
	2. Motorrad	5
C	Privatunfall 1. Biss- und Schussverletzung	1
	2. alkoholbedingte Stürze	3
	3. sonstige Stürze, Absturz	3
D	Chronische Osteomyelitis	1
Total:		19

Ausschlaggebend für die Versorgung des Wundareals mit einem Lappen waren in allen Fällen das Ausmaß der Verletzung oder vorherige erfolglose alternative Behandlungen. Dabei wurden die Patienten im Mittel 48,5 Tage nach Geschehen des Traumas operativ mit einer plastischen Deckung mittels eines Muskellappens versorgt.

Die durchschnittliche Verweildauer der Patienten aufgrund der Transplantationsoperation in der Plastischen Chirurgie betrug 48,2 Tage. Die kürzeste Zeitdauer umfasste 27 Tage und die längste 94 Tage. Anschließend konnten alle Patienten mit gut abgeheilten Wundverhältnissen zur weiteren Behandlung in die überweisende Klinik zurückgeschickt oder in die häusliche Umgebung entlassen werden.

Tabelle 3: Patientenübersicht

Patient	m/w	Alter (J)	Trauma	Lappenart	Defektlokalisation	Gefäßanschluss
1	♂	55	C1	FMLD	offene Defektverletzung re. Vorfuß subtotale Amputation 5. Zehe, Fraktur Metatarsale III,IV,V	A. tibialis ant. E/S V. comitans
2	♂	56	A	FMLD	III° offene Fraktur li. Unterschenkel	A. poplitea E/S V. poplitea E/S
3	♂	28	B1	FMLD	II° offene Fraktur li. Unterschenkel	A. tibialis post. E/S V. tibialis post. E/S
4	♂	48	C2	FMLD	Calcaneusfraktur re. mit Osteomyelitis, Wundheilungsstörung	A. tibialis post. E/S V. tibialis post. E/E
5	♂	21	B1	FMLD	III° offene Trümmerfraktur li. Unter- schenkel, offene Innenknöchelfraktur li., Kompartmentsyndrom li.	Truncus tibiofibularis E/S
6	♂	49	B1	FMLD	III° offene Fraktur re. Unterschenkel mit Freiliegen der Tibia	A. poplitea E/S V. tibialis post. E/S
7	♂	37	B2	FMLD	Osteonekrose Tibia li. nach Luxationsfraktur oberes Sprunggelenk, mehrf. Talusfraktur li., nicht dislozierte Weber-B-Fraktur li.	A. poplitea E/S V. poplitea E/S
8	♂	45	B2	FMLD	offene obere Sprunggelenksluxation re. mit Talusverlust	A. tibialis ant. E/S V. tibialis ant. E/S
9	♂	53	C3	R	offene Calcaneusfraktur li.	A. tibialis post. E/E V. tibialis post. E/E
10	♂	17	B1	FMLD	Talusenuklation li., Luxatio talo totalis, Außenknöchelfraktur	A. tibialis ant. E/S V. comitans E/E
11	♂	38	A	FMLD	Haut- und Weichteildefekt re. Unter- schenkel; knöcherner Bandausriss dorsale Fibula re.	A. tibialis post. E/E V. tibialis post. E/E
12	♀	38	C3	FMLD	infizierte Plattenosteosynthese bei distaler Unterschenkelfraktur mit freiliegendem Malleolus medialis	A. tibialis post. E/S V. comitans E/E
13	♂	23	C2	FMLD	Calcaneusfraktur beidseits mit chronischer Osteomyelitis	A. fibularis E/S V. comitans E/E
14	♂	18	C2	FMLD	Oberschenkelamputation re. mit III° offener Trümmerfraktur des Unterschenkels, Oberschenkel- schaftfraktur re.	A. femoralis E/E V. femoralis E/E
15	♂	41	C3	FMLD	komplexe Unterschenkelfraktur re. mit Weichteildefekt	A. tibialis post. E/E V. tibialis post. E/E
16	♂	56	D	FMLD	Weichteildefekt bei Z.n. chronischer Osteitis li. Tibia (offene Fraktur '89)	A. poplitea E/S V. poplitea E/S
17	♂	40	B2	FMLD	Pilonfraktur re und III° offene Trümmerfraktur re. Calcaneus	A. tibialis post. E/E V. tibialis post. E/E
18	♂	21	B2	FMLD	III° offene Trümmerfraktur re. Unter- schenkel, II° offene Femurschaft- fraktur re.	A. poplitea E/S V. poplitea E/E
19	♂	21	B2	FMLD	offene Tibiakopffraktur li. mit Haut- und Weichteildefekt; Fibulafraktur li.	A. poplitea E/S V. poplitea E/S

Lappenart: FMLD – myokutaner Latissimus dorsi Lappen
R – Radialislappen

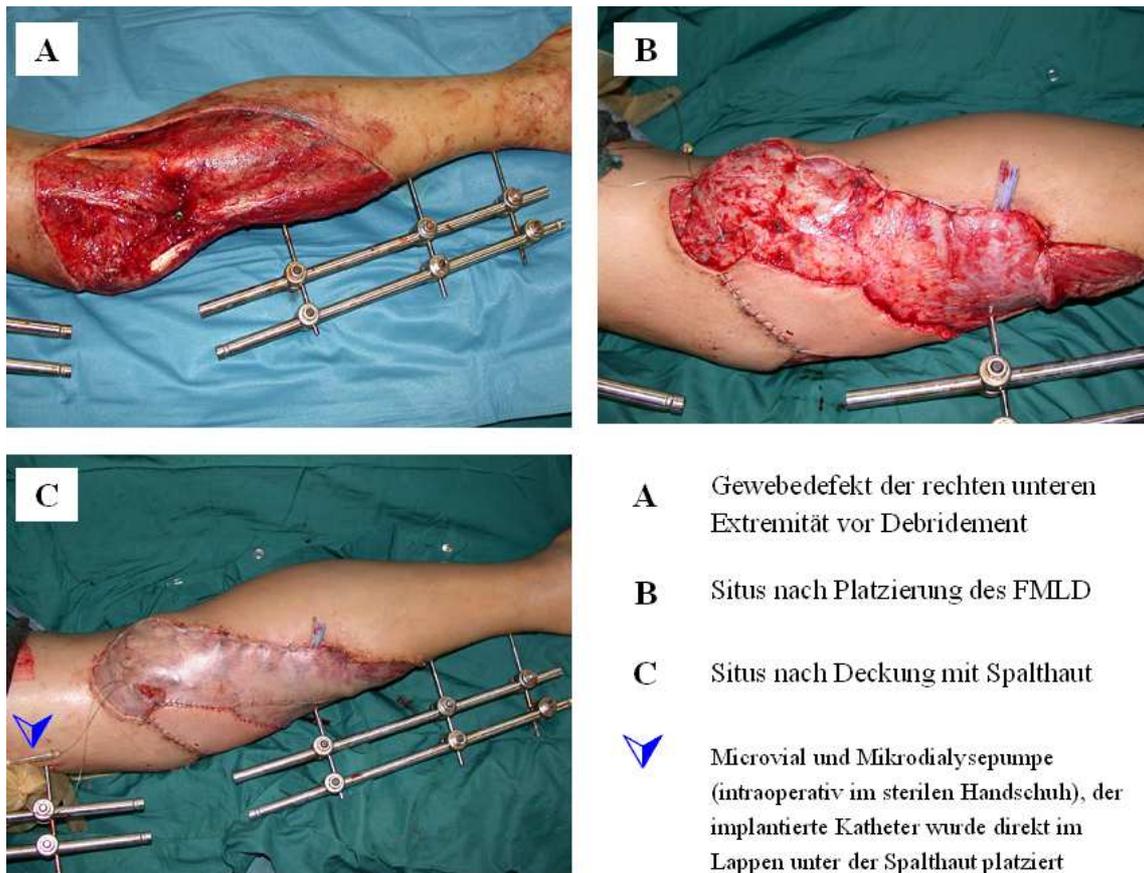
E/S – End zu Seit
E/E – End zu End

Trauma: Tabelle 2

2.2. Operatives Vorgehen

Jeder Patient wurde mit zwei Mikrodialysekathetern (CMA 60 Microdialysis Catheter, CMA, Stockholm, Schweden) versorgt. Ein Katheter wurde nach der Lappenhebung direkt im Muskelgewebe des zu transplantierenden Muskellappens platziert; der zweite Katheter wurde in gesundes Referenzgewebe implantiert.

Abbildung 4: Intraoperativer Situs

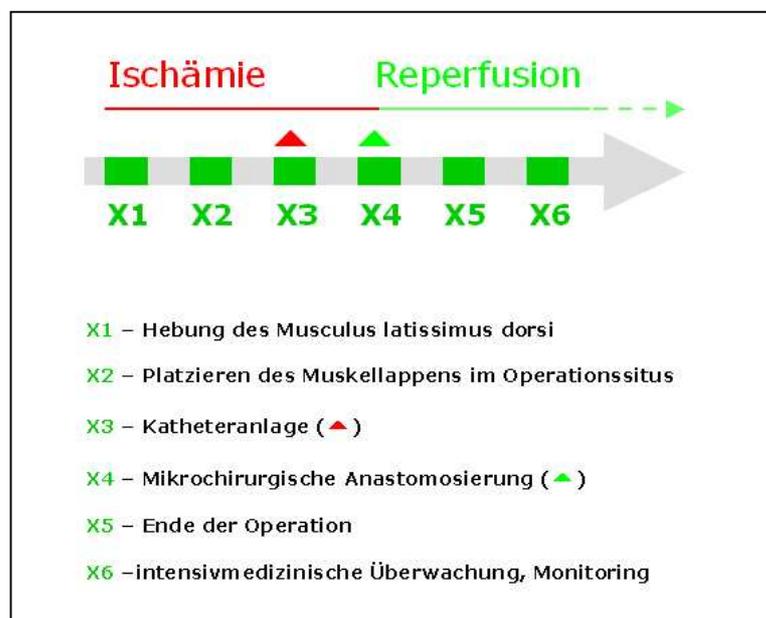


Als Referenzgewebe wurde bei 10 Patienten die kontralaterale und bei 9 Patienten die ipsilaterale Beinmuskulatur verwendet. Die Zuordnung geschah randomisiert aufgrund technischer Gegebenheiten wie Operationssituation, Patientenlagerung, Lokalisation und Ausdehnung der Verletzung. Eine Ischämie des ipsilateralen Kontrollgewebes unter der Operation konnte ausgeschlossen werden, da dieses stets außerhalb des Operationsgebietes lag.

Die Katheteranlage erfolgte durch den Operateur. Die Mikrodialysepumpe (CMA 107, CMA Microdialysis AB, Stockholm, Schweden) wurde auf eine Geschwindigkeit von 2 μ l/min eingestellt. Die Spritze (3,0 ml Reservoir, MiniMed, Sylmar CA, USA) wurde mit minimal

2,5 ml bis maximal 2,8 ml Ringerlösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) befüllt. Die Probengewinnung begann nach einer 10-minütigen Einlaufphase, in der der Katheter durch eine Werksvoreinstellung mit der Ringerlösung in „flush“-Sequenz durchspült wurde. Der Wechsel der Microvials (CMA, Schweden) erfolgte simultan im Muskelgewebe und Referenzgewebe alle 90 Minuten sowohl während der Ischämiephase als auch nach Reperfusion. Dabei wurden die Katheter grundsätzlich zu Beginn der Reperfusion gewechselt. Die Proben wurden bei Patienten ohne Komplikationen bis 18 Stunden post reperfusionem abgenommen und bei Patienten mit Komplikationen die Überwachungszeit entsprechend angepasst und verlängert (Abbildung 5). Die Ischämiezeit wurde berechnet vom Zeitpunkt der Unterbrechung der arteriellen Versorgung des Muskellappens bei Hebung bis zur Wiedereröffnung der Strombahn nach Anastomosierung im Empfängergebiet. Traten nach der Reperfusion Komplikationen auf, so wurde die gesamte Zeit bis zur erfolgreichen Revision als Ischämiezeit definiert.

Abbildung 5: Operationsverlauf



Die gewonnenen Proben wurden nach dem Wechsel in einem Eisschrank bei -5 Grad Celsius aufbewahrt und am Ende der Messungen bis zur Datenanalyse in einem Tiefkühlgerät (economic froster, BOSCH) bei -30 Grad Celsius gelagert.

Die Bestimmung der Konzentrationen der immunologischen Parameter C3a, RANTES und Interleukin-8 wurden unter Verwendung spezifischer Enzymimmunoassays durchgeführt. Es wurden die Proben während der Ischämiezeit, sowie zu den Zeitpunkten Reperfusion – 90

Minuten, 181 – 270 Minuten, 541 – 630 Minuten und 811 – 900 Minuten nach Reperfusion analysiert.

Bei allen gewonnenen Proben erfolgte eine Analyse auf Glukose, Laktat, Pyruvat und Glycerol mit dem CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA, Schweden).

Darüber hinaus wurde bei allen Lappen ein klinisches Monitoring der Hautinsel mit zusätzlicher Überwachung der Vitalzeichen und Beschwerden des Patienten in Abständen von einer Stunde durchgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Klinisches Monitoring

	klinisches Monitoring	Bewertung
Rekapillarisation	< 1 Sekunde	1a
	2 - 4 Sekunden	1b
	> 5 Sekunden	1c
Lappenturgor	weich	2a
	fest	2b
	hart	2c
Farbe der Hautinsel	blass	3a
	rosa / rot	3b
	livide	3c

Eine normale und zufriedenstellende Lappensituation wurde mit 1b, 2b, 3b bewertet. Bei Abweichungen der Situation zu diesem „Normalfall“ wurde die Lagerung des Patienten und der betroffenen Extremität, Flüssigkeitshaushalt, Vitalzeichen sowie Verbände durch den diensthabenden Arzt überprüft. Bei Weiterbestehen des schlechten klinischen Bildes wurde der verantwortliche Operateur hinzugezogen, der über eine erneute Operation zu entscheiden hatte.

Bei einem Patienten konnte aufgrund des intraoperativen Entfernens der Monitorinsel nur ein Monitoring aufgrund der Lappenblutungen nach Skarifizieren durchgeführt werden. Der Lappen wurde an geeigneter Stelle mit einer spitzen Kanüle geritzt und die Durchblutung des Lappens beurteilt.

2.2.1. Transplantation des Musculus latissimus dorsi

Die Indikation zu einer freien myokutanen Gewebetransplantation mit dem Musculus latissimus dorsi wurde aufgrund der bestehenden Verletzungen gestellt (Tabelle 5). Als Indikationen wurden gewertet: ausgedehnte Haut- und Weichteilverletzungen, freiliegende Knochenanteile, ausgedehnte infizierte Weichteilverletzungen, Amputationsverletzungen und chronische Osteomyelitis.

Tabelle 5: Indikation für Lappentransplantation

Indikation	Patienten (n=19)
Großflächige Haut- und Weichteilverletzungen	3
Offene Frakturen, Knochen liegt frei	11
Amputation mit Weichteildefekt	2
Chronische Osteomyelitis	3

In Abhängigkeit der Verletzungsausdehnung, Erstversorgung und Begleitverletzungen erfolgte zunächst das ein- oder mehrzeitige Débridement. Das Débridement galt als abgeschlossen, wenn mangeldurchblutetes oder avitales Gewebe radikal entfernt worden war und punktförmige Blutungen auf eine ausreichende Blutversorgung und Vitalisierung im angrenzenden Gewebe hinwiesen. Die eigentliche Operation begann zunächst mit der exakten Lagerung und Polsterung des Patienten. Es wurde ein 2-Team-Vorgehen gewählt. Das erste Team führte ein weiteres Débridement des Defektes durch und präparierte die Gefäßanschlüsse frei. Die Mikrogefäßanschlüsse lagen dabei proximal der Läsion im gesunden Gewebe. Das zweite Team präparierte parallel dazu das Muskelgewebe und die thoracodorsalen Gefäße des Musculus latissimus dorsi. Nach Bestimmung der Größe wurde nun der Muskel abgesetzt und vom ersten Team übernommen. Es folgten das lockere Einnähen des Transplantates und die mikrochirurgische Naht der Gefäßanastomosen unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops. Nach einer erfolgreichen „Einlaufzeit“ von rund 30 Minuten wurde der Muskellappen nun vollständig im Defektgebiet fixiert und mit Spalthauttransplantaten (meist von einem Oberschenkel oder der Gesäßregion) gedeckt. Parallel dazu wurde durch das zweite Team der Hebedefekt nach ausgiebiger Blutstillung und Drainageeinlage verschlossen. Die weitere Wundversorgung des Lappens erfolgte mit Adaptic® (Johnson + Johnson, Ethicon) und lockerem Watteverband (Cellona®, Lohmann & Rauscher internationale GmbH & CoKG, Rengsdorf). Die Monitorinsel wurde dabei für ein

klinisches Monitoring ausgespart. Die Stabilisierung des Transplantates wurde mit einem Fixateur externe oder durch eine halbseitige Gipsschiene gewährleistet. Anschließend kam der Patient auf eine intensivmedizinische Überwachungsstation. Die mit dem Transplantat versorgte Extremität wurde leicht erhöht ohne Druck auf das transplantierte Muskelgewebe und mit Fersenfremieit gelagert.

2.2.2. Transplantation des Radialislappen

Bei einem Patienten fanden sich geringe Haut- und Weichteilverletzungen mit einem freiliegenden Calcaneusanteil ohne Kortikalisverletzungen. Aufgrund der vergleichsweise geringen Defektgröße sowie der Defektlokalisierung wurde hier ein Radialislappen verwendet. Auch hier wurde ein 2-Team-Vorgehen gewählt. Das erste Team begann mit dem ausführlichen Débridement des Defektes und anschließend erfolgte das Präparieren der Gefäßanschlüsse. Das zweite Team bestimmte Form und Größe des Lappens. Nach Anlage der Blutsperrung am Oberarm wurde die Arteria radialis am Handgelenk identifiziert und ihr Verlauf nach proximal dargestellt. Tiefe Versorgungsäste zur Muskulatur und Sehnenansätze wurden ligiert ebenso wie die Venae comitantes, wobei die Faszie und die versorgenden Seitenäste erhalten wurden. Es wurde intraoperativ durch Abklemmen der Arteria radialis nochmals die ausreichende Blutversorgung der Hand über die Arteria ulnaris (Allen – Test) gezeigt und schließlich die Arteria radialis distal ligiert und proximal durchtrennt. In der Zwischenzeit hatte das zweite Team die Läsion debridiert. Das Débridement galt auch hier als abgeschlossen, wenn makroskopisch sichtbare Nekrosen entfernt waren und punktförmige Blutungen auf vitales Gewebe hinwiesen. Ebenso war zum Zeitpunkt der Lappenabtrennung die Präparation der Empfängergefäße bereits abgeschlossen. Nach Übernahme des Transplantates begann das Team mit der Anpassung des Lappens in den Defektbereich. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops die arterielle und venöse Anastomose genäht. Nach einer „Einlaufzeit“ von 30 Minuten wurde das Lappentransplantat nun vollständig in den Defekt eingenäht. Es folgte die Deckung der verbliebenen Restdefekte mit Spalthauttransplantaten. Das erste Team versorgte währenddessen das Spenderareal. Dabei wurde die Defektstrecke der Arteria radialis mit einem Veneninterponat (V. saphena magna) überbrückt und der restliche Defekt mit Spalthaut gedeckt. Auch hier erfolgte die weitere Wundversorgung wie oben dargestellt sowie durch anschließende Ruhigstellung mittels einer Gipsschiene.

2.2.3. Mikrodialysetechnik

Die Mikrodialysetechnik (Abbildung 6) beruht auf dem Prinzip der Diffusion von Substanzen aus der Extrazellulärflüssigkeit entlang einer semipermeablen Membran in das Katheterinnere. Die Membran lässt eine Diffusion von Substanzen mit einer maximalen Molekülgröße von 20 kDa zu. Das entstandene Dialysat wird an der Katheterspitze in das Katheterinnere geleitet, so dass während des Transportes in das Sammelgefäß (= Microvial) keine weiteren Konzentrationsänderungen mehr stattfinden können (Abbildung 1, Einleitung). Der Körper des Probensammelgefäß (Microvial, CMA, Schweden) besteht aus Polysteren 144C BASF mit Gummiverschlüssen aus Santoprene 64 an beiden Enden. Es hat ein maximales Fassungsvermögen von 200 µl.

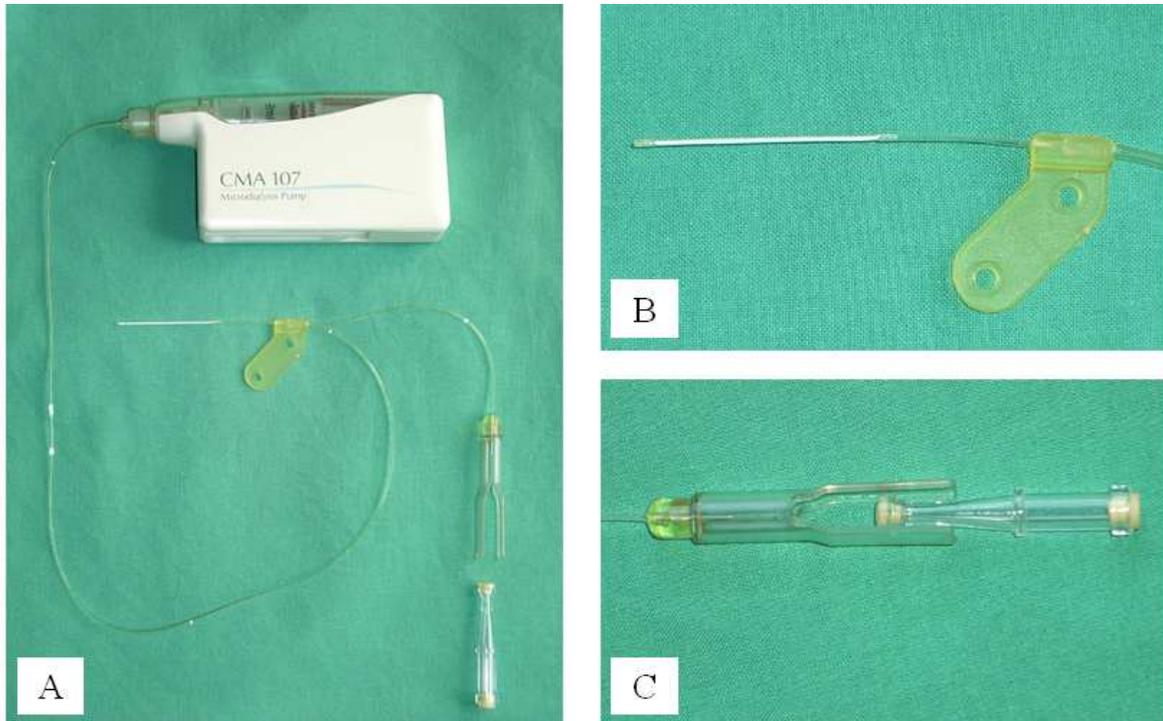
Der CMA 60 Mikrodialysekatheter (CMA, Schweden) ist speziell für ein Monitoring von Substanzen in Muskel- und subkutanem Fettgewebe entwickelt worden. Er besteht aus einer 30 mm langen und im Durchmesser 0,6 mm messenden Membran aus Polyamid. Der zuführende Schlauch, der abführende Schlauch und der Schaft des Katheters bestehen aus Polyurethan. Der zuführende Schlauch ist 400 mm lang und hat einen Durchmesser von 1,0 mm. Der abführende Schlauch weist bei einer Länge von 105 mm den gleichen Durchmesser auf. Der Schaft misst 20 mm in der Länge und 0,9 mm im Durchmesser. Die Insertionskanüle besteht aus rostfreiem Stahl und hat eine Länge von 54 mm und einen Durchmesser von 1,4 mm.

Die Katheter wurden mit Hilfe einer Insertionskanüle in das Gewebe eingebracht. Nach dem Entfernen der Kanüle konnte der Katheter mittels Nahtmaterial (2/0, Terylene®, Serag Wiessner, Naila) am Gewebe fixiert und die Mikrodialysepumpe CMA 107 mit dem Katheter konnektiert werden. Das Befüllen der Spritze erfolgte mit Ringerlösung. Anschließend wurde das Ende des Spülzyklus und eine 10-minütige Einlaufphase abgewartet und das erste Probengefäß (Microvial) eingesetzt. Der Wechsel der Microvials erfolgte simultan in Muskel – und Referenzgewebe alle 90 Minuten während der Ischämiephase und nach Reperfusion. Die Mikrodialysepumpen wurden anschließend in sterile Handschuhe (Biogel®) verpackt und gesichert. Die gewonnenen Proben wurden nach dem Wechsel in einem Eisschrank bei -5 Grad Celsius aufbewahrt und am Ende der Messungen bis zur Datenanalyse in einem Tiefkühlgerät bei -30 Grad Celsius gelagert.

Die Mikrodialysepumpe CMA 107 hat eine Größe von 90 x 50 x 20 mm und wiegt rund 70g. Sie wird mit 6V Batterien betrieben mit einer durchschnittlichen Laufdauer von 14 Tagen bei Dauerbetrieb. Das Gehäuse der Pumpe besteht aus Plastik und ist spritzsicher. Die Mikrodialysepumpe wurde auf eine Geschwindigkeit von 2 µl/min eingestellt, wobei die

Geschwindigkeit des Spülzyklus 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ beträgt (Werkseinstellung). Die Pumpe verfügt über verschiedene Leuchtsignale, so dass Alarmfunktionen vom problemlosen Betrieb der Pumpe abgrenzbar sind.

Abbildung 6: Mikrodialysetechnik



- A. Mikrodialysepumpe, Kathetersystem, Microvial
- B. Katheter mit semipermeabler Membran
- C. Microvial (Sammelgefäß)

2.3. CMA-Analyse

Der CMA 600 Microdialysis Analyzer wurde speziell für die Anforderungen des Monitoring auf Krankenhausstationen entwickelt. Da der Klinik für Plastische Chirurgie kein eigenes Gerät zur Verfügung stand, wurden in Absprache mit Herrn PD Dr. J. Gliemroth und Frau Dr. A. Klöhn aus der Klinik für Neurochirurgie die dortigen Geräte genutzt. Das System besteht aus dem Analysegerät, Monitor, Computersystem und Drucker auf einem mobilen Wagen. Das Analysegerät hat eine ungefähre Größe von 445 x 393 x 345 mm und wiegt rund 23 kg. Die Analyse einer Substanz dauert zwischen 60 und 90 Sekunden, wobei ein Volumen von 2 μl pro Probe und einer zu messenden Substanz benötigt wird. Das Messprinzip beruht auf der kinetischen colorimetrischen Messung bei einer Lichtwellenlänge von 546 nm für Glukose, Laktat, Pyruvat, Glycerol und Glutamat (Tabelle 6) und 365 nm für Harnstoff. Dabei wird die Absorptionsänderung während der ersten 30 Sekunden gemessen und die maximale Reaktion als Quantifizierung für den weiteren Verlauf genutzt.

Die Microvials wurden mit Beginn der einstündigen Kalibrierung bei Zimmertemperatur vorsichtig aufgetaut und nach Eingabe der Patienteninformationen alle Proben auf Glukose, Laktat, Pyruvat und Glyzerol untersucht. Die analysierten Proben wurden anschließend verworfen.

Tabelle 6: CMA - Substananalyse

Reagenz	Analyseprinzip
Glukose	<p>Messung der rot-violetten Farbstoffänderung bei 546 nm</p> $\text{D-Glukose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Glukonolaktone} + \text{H}_2\text{O}_2$ $2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Phenol} + 4\text{-Amino-Antipyrin} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 4 \text{H}_2\text{O}$ <p>[GOD – Glukoseoxidase; POD – Peroxidase]</p>
Laktat	<p>Messung der rot-violetten Farbstoffänderung bei 546 nm</p> $\text{L-Laktat} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{LOD}} \text{Pyruvat} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Chlorphenol} + 4\text{-Amino-Antipyrin} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$ <p>[LOD – Laktatoxidase; POD – Peroxidase]</p>
Glyzerol	<p>Messung der rot-violetten Farbstoffänderung bei 546 nm</p> $\text{Glyzerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glyzerol-3-Phosphat} + \text{ADP}$ $\text{Glyzerol-3-Phosphat} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihydroxyazetonphosphat} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DCHBS} + 4\text{-Amino-Antipyrin} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$ <p>[GK – Glyzerolkinase; GPO – Glyzerol-3-Phosphateoxidase; POD – Peroxidase]</p>
Pyruvat	<p>Messung der rot-violetten Farbstoffänderung bei 546 nm</p> $\text{Pyruvat} + \text{O}_2 + \text{anorgan. Phosphat} \xrightarrow{\text{PyrOx}} \text{Acetylphosphat} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TOOS} + 4\text{-Amino-Antipyrin} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 4 \text{H}_2\text{O}$ <p>[PyrOx – Pyruvatoxidase; POD – Peroxidase]</p>

2.4. Enzymimmunoassay

Alle verwendeten Enzymimmunoassays bestimmten quantitativ die Substratkonzentrationen in den Mikrodialysatproben. Sie benutzen das Prinzip der Sandwich-Technik, wobei die optische Dichte bei 450 nm gemessen wird. Dieser Wert wird in Korrelation mit der Standardkurve und den Leerwerten gesetzt und die Konzentration der Probe angegeben.

Die Versuche wurden im ELISA-Labor des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin durchgeführt. Dabei wurden neben den Standardlaboreinrichtungen (Messutensilien, Pipetten) auch spezielle Geräte verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: verwendete spezielle Laborartikel

Laborartikel	Firma
Drucker	Precicolor, Fortuna Brand
Rotator	Titramax 100 Heidolph, Schwabach
Spektrometer	anthos reader 2001 anthos labtec instruments Salzburg, Österreich
Vortex	REAX 2000 Heidolph, Schwabach
Waschautomat	Columbus Washer Tecan, Crailsheim
Mikrotiterplatten	Microtest U-Bottom, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

Die bei -30 Grad Celsius tiefgefrorenen Proben wurden langsam aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach Entnahme der benötigten Probenmengen aus den Microvials wurden die Proben erneut bei -30 Grad Celsius eingefroren und gelagert. Vor Entnahme der gebrauchten Volumina wurden die Proben mit einem Vortexgerät für 10 Sekunden durchmischt. Alle Proben wurden in sterilen Mikrotiterplatten auf die vorgesehene Verdünnung vorbereitet. Die Verdünnung wurde anschließend in der jeweiligen Testmikrotiterplatte weiter verwendet.

Durch das begrenzte Probenvolumen (180 µl Volumen pro Probe; 90 Minuten bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2µl/min) musste bei den Enzymimmunoassays von RANTES und Interleukin-8 auf eine Doppelbestimmung verzichtet werden. Beim C3a-Enzymimmunoassay konnten dagegen Doppelbestimmungen mit unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt werden.

Insgesamt wurden 18 Enzymimmunoassays durchgeführt, von denen zwei wiederholt werden mussten. Die Konzentrationen von C3a und Interleukin-8 wurden bei allen Patienten ermittelt. Die Konzentrationen von RANTES wurden nur von den ersten Patienten bestimmt, da die

Konzentration im Laufe der vier Assays unter der Nachweisgrenze des Testkits lagen. Aufgrund des geringen Probenvolumens wurde deshalb auf weitere Analysen von RANTES verzichtet.

Tabelle 8: Übersicht – Kumulierte Meßzeitpunkte der Enzymimmunoassays

Nachweis von	Datum	Anmerkungen
C3a	24.04.2002 11.10.2002 19.02.2003 23.04.2003 11.09.2003 16.01.2004 05.03.2004	Wiederholung notwendig
Interleukin-8	24.04.2002 11.10.2002 19.02.2003 23.02.2003 11.09.2003 26.02.2004 10.09.2004	Wiederholung notwendig
RANTES	25.04.2002 11.10.2002 19.02.2003 22.04.2003	

2.4.1. C3a

C3a entsteht im Körper durch die Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b. Angeregt wird diese Bildung sowohl durch den klassischen, den alternativen und auch durch den Lektin-Aktivierungsweg. Das Anaphylatoxin C3a ist sehr kurzlebig und wird im Serum schnell in C3a(desArg) umgewandelt. Der Enzymimmunoassay (Quidel, San Diego CA, USA, Vertrieb durch Innogenetics GmbH, Heiden) bestimmte quantitativ C3a(desArg) Fragmente im Mikrodialysat.

Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen, spezifischen Antikörpern gegen C3a(desArg) beschichtet. Während der Inkubationszeit bindet C3a(desArg) an die spezifischen Antikörper. Ungebundene C3a(desArg) Fragmente werden beim Waschvorgang entfernt. Mit Hilfe von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-C3a werden die gebundenen C3a-Fragmente detektiert. Die C3a-Konzentration der Mikrodialyseprobe wird mittels der optischen Dichte (O.D.) bei 450 nm gegen eine Standardkurve ermittelt und in ng C3a /ml angegeben.

Die ersten Testergebnisse zeigten, dass C3a Konzentrationen bei der empfohlenen Probenverdünnung von 1:100 nicht messbar waren. Die folgenden Messungen wurden mit Verdünnungsreihen von 1:10, 1:20 und 1:30 durchgeführt, wobei die 1:10 und 1:20 Verdünnungen eindeutige Ergebnisse zeigten.

Testdurchführung:

1. *Pipetieren von 100 µl der Standards, Kontrollen und Probenverdünnungen in die Titerplatte*
2. *Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur*
3. *Waschvorgang*
4. *Pipetieren von 100 µl Konjugat (Kaninchen Anti-C3a) in die Titerplatte*
5. *Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur*
6. *Waschvorgang*
7. *Pipetieren von 100 µl TMB-Substrat-Lösung in die Titerplatte*
8. *Inkubation: 15 Minuten bei Raumtemperatur*
9. *Pipetieren von 100 µl Stopplösung in die Titerplatte*
10. *Messung der O.D. bei 450 nm innerhalb von 60 Minuten gegen den Leerwert*

2.4.2. Interleukin-8

Der human Interleukin-8/NAP-1 Enzymimmunoassay (Bender MedSystems, Wien, Österreich) misst quantitativ die vorhandene Konzentration von Interleukin-8 im Mikro dialysat.

Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen Anti-IL-8/NAP-1 beschichtet. Das im Mikro dialysat vorhandene IL-8 bindet an diese Antikörper. Ein hinzugegebenes HRP-Konjugat enthält polyklonale Antikörper und bindet so an die bereits gebundenen IL-8 Moleküle. Überschüssiges Konjugat wird entfernt und eine hinzugegebene Substratlösung reagiert mit dem gebundenen Konjugat. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen und die Konzentration gegen einen Leerwert auf einer Standardkurve ermittelt und in pg IL-8 /ml angegeben.

Für die Testdurchführung wurden Probenverdünnungen von 1:2 durchgeführt.

Testdurchführung:

1. *Waschvorgang*
2. *Pipetieren von 100 µl der Standards, Kontrollen und Probenverdünnungen in die Titerplatte*
3. *Pipetieren von 50 µl HRP-Konjugat in die Titerplatte*
4. *Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur*
5. *Waschvorgang*
6. *Pipetieren von 100 µl TMB-Substrat-Lösung in die Titerplatte*
7. *Inkubation: 15 Minuten bei Raumtemperatur*
8. *Pipetieren von 100 µl Stopplösung*
9. *Messung der O.D. bei 450 nm*

2.4.3. RANTES

Der Human-RANTES-Enzymimmunoassay (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) misst ebenfalls quantitativ die vorhandene RANTES-Konzentration des Probenvolumens.

Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalem Antikörper gegen RANTES beschichtet. Das in der Probe vorhandene RANTES bindet während der Inkubationszeit an diese Antikörper. Bei einem Waschgang wird überschüssiges Material entfernt. Das anschließend hinzugegebene Konjugat enthält polyklonale Antikörper gegen RANTES kombiniert mit einer Peroxidase. Bei einer erneuten Inkubation verbindet sich das Konjugat mit den bereits gebundenen RANTES-Molekülen. Die nach einem Waschgang hinzugegebene Substratlösung reagiert nun mit dem gebundenen Konjugat. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen und aus der gemessenen O.D. die Konzentration der Proben im Vergleich zum Leerwert und der Standardkurve ermittelt. Die Konzentrationen werden in pg RANTES /ml angegeben.

Der Human RANTES Enzymimmunoassay wurde mit einer Probenverdünnung von 1:4 durchgeführt.

Testdurchführung:

1. *Pipetieren von 100 µl der Standards, Kontrollen und Probenverdünnungen in die Titerplatte*
2. *Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur*
3. *Waschvorgang*
4. *Pipetieren von 200 µl Konjugat in die Titerplatte*
5. *Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur*
6. *Waschvorgang*
7. *Pipetieren von 200 µl Substrat-Lösung in die Titerplatte*
8. *Inkubation: 15 Minuten bei Raumtemperatur, Vermeidung von Licht*
9. *Pipetieren von 50 µl Stopplösung in die Titerplatte*
10. *Messung der O.D. bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten gegen den Leerwert*

2.5. Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism, Version 4 von GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA durchgeführt. Die immunologischen und metabolischen Parameter wurden als Quotient [Lappenkonzentration] / [Referenzkonzentration] aufgeführt und zusammen mit den Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung der metabolischen und immunologischen Substanzen erfolgte mit dem Two-Way-Anova-Test in Kombination mit dem Bonferroni Posttest. Für die Signifikanzbestimmung der Ischämiezeiten wurde ein paariger t-Test durchgeführt.

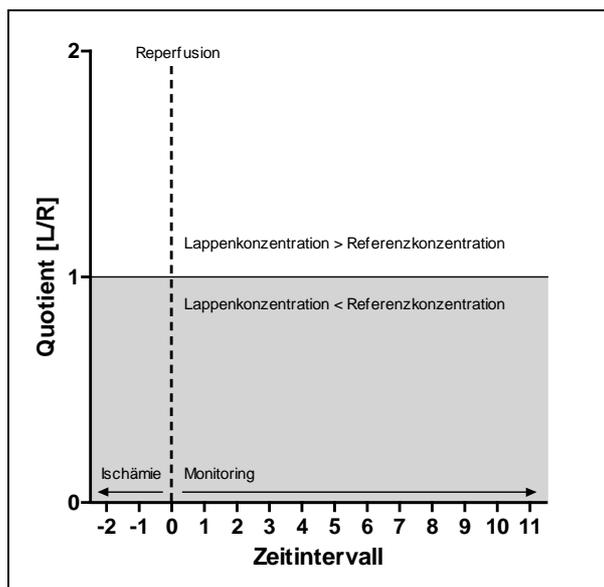
Für die Berechnung von Ausreißerdaten wurde der Grubbs – Test verwendet, um statistische Ausreißer mit einer Signifikanz von $P < 0,05$ zu errechnen.

2.6. Allgemeine Berechnung und graphische Darstellung

Jeder Patient wurde intraoperativ mit zwei Mikrodialysekathetern versorgt, je einem im transplantierten Lappengewebe und im gesunden Referenzgewebe. Da sich die Patienten in Konstitution, Alter, Geschlecht und in der Verletzungsart, -ausdehnung und Lappengröße

unterschieden, galt jeder Patient als eigene Kontrolle. Die Daten wurden daher pro Patient als Quotient aus der Konzentration des Lappengewebes geteilt durch die Konzentration des Referenzgewebes angegeben, um individuelle Einflüsse auf die Ergebnisse zu minimieren. Ein Quotient von eins bedeutet somit gleiche Konzentrationen im Lappengewebe und Referenzgewebe. Ein Quotient von größer eins beschreibt eine größere Konzentration der Substanz im Lappen und ein Quotient kleiner eins eine größere Konzentration im Referenzgewebe (Abbildung 7).

Abbildung 7: Graphische Darstellung



Die Daten sind zeitlich in zwei Richtungen aufgetragen, wobei der Zeitpunkt 0 die Reperfusion des Lappengewebes kennzeichnet. Nach links sind mit steigendem Zahlenwert die verlängerten Ischämiezeiten aufgelistet. Die Konzentrationsbestimmung der metabolischen und der immunologischen Substanzen ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen worden. Nach rechts auf der x-Achse ist für die metabolischen Substanzen die Monitoringdauer bis 1080 Minuten (18 Stunden) fortlaufend in 90-minütigen Intervallen abgebildet. Für die immunologischen Parameter wurden definierte Zeitabschnitte auf der x-Achse aufgetragen.

Die Graphen wurden hinsichtlich ihrer maximalen und minimalen Ausdehnung betrachtet, sowie der Unterschiede beider Graphen und deren Signifikanz. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Faktoren Zeit (Reperfusionsdauer) [Effekt_{Zeit}] und Komplikation [Effekt_{Kompl.}] untersucht. Die Nullhypothese bedeutet, dass die Faktoren keine Veränderung der Graphenverläufe bewirken. Eine Beeinflussung durch den Faktor Zeit [Effekt_{Zeit}] lag vor,

wenn mit steigender Monitoringdauer, beide Graphen eine charakteristische Entwicklung zeigten, die auf die Reperfusion als auslösendes Ereignis zurückführbar war. Ein Einfluss durch die Komplikation [Effekt_{Kompl.}] bestand, wenn die Graphen – wenn auch statistisch nicht signifikant unterschiedlich – einen ungleichen Verlauf zeigten und nicht parallel verliefen.

3. Ergebnisse

3.1. Patientendaten

Das Patientenkollektiv bestand aus 19 Patienten: eine weibliche und 18 männliche Personen. Das Durchschnittsalter lag bei 37,1 Jahren. Der jüngste Patient war 17 Jahre, der älteste 58 Jahre alt. Durchschnittlich wurden die Patienten 48,5 Tage nach Trauma operativ durch eine Wunddeckung mit Hilfe des Muskellappens versorgt. Es ließ sich bei einem Patienten das genaue Datum des Unfalls im Jahre 1989 nicht mehr rekonstruieren. Daher wurde eine Zeitdauer von 5110 Tagen angenommen (Unfall 1989, Operation im März 2003, 14 Jahre = 5110 Tage). Bei der statistischen Auswertung mit Hilfe des Grubbs – Tests konnte dieser Wert mit einer Signifikanz von $P < 0,05$ als Ausreißer gewertet werden und wurde somit in die Berechnung nicht mit einbezogen.

Die Patienten verblieben durchschnittlich 48,7 Tage in der Klinik für Plastische Chirurgie. Der kürzeste Aufenthalt betrug 27 Tage und der längste 94. Der Aufenthalt wurde inklusive Aufnahme- und Entlassungstag berechnet. Nicht berücksichtigt wurden vorhergehende Aufenthalte oder Folgeaufenthalte aufgrund weiterer Untersuchungen oder Komplikationen.

Die Patienten konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Gruppe A ohne Komplikationen während oder nach der Lappentransplantation beinhaltete zwölf Patienten. Bei einem dieser Patienten musste die Monitorinsel während der Lappenhebung aus technischen Gründen von der Blutversorgung getrennt und entfernt werden. Die Gruppe B mit Komplikationen zählte insgesamt sieben Patienten. Bei fünf dieser Patienten gab es intraoperative Probleme in Form von arteriellen oder venösen Thrombusbildungen, die während der Operation revidiert wurden. Zwei Patienten wiesen während der Operation keine Auffälligkeiten bezüglich des Lappenmonitoring auf. Dennoch wurde während der nächsten 16-19 Stunden zunehmend eine Verschlechterung der Lappendurchblutung registriert und am folgenden Tag operativ revidiert. In einem der Fälle hatte sich ein Ödem im angrenzenden Gewebe ausgebildet, das zu ungünstigen Zu- und Abflussbedingungen durch einen zunehmenden Druck auf die Anastomose führte. Bei dem zweiten Patienten wurde bei der Re-Operation ein venöser Thrombus entfernt. Bei allen transplantierten Muskellappen konnte ein gutes Ergebnis erzielt werden und alle Lappen heilten ohne größeren funktionellen Gewebeverlust (< 5 % Gewebeverlust) ein.

In den Folgeuntersuchungen während des Klinikaufenthaltes zeigten sich bei vier Patienten Nekroseareale an funktionell unbedeutenden Muskellappenrändern, die während einer erneuten Operation debridiert wurden. Ein Patient wies nekrotische Veränderungen der

gesamten Hautmonitorinsel auf, so dass diese entfernt werden musste. Der Defekt wurde anschließend mit Spalthaut gedeckt und heilte folgenlos aus. Bei drei Patienten traten rezidivierende Entzündungen im Bereich der früheren Defektzone auf. Bei zwei von ihnen zeigten sich bei intraoperativer Begutachtung Knochennekrosen. Es wurde eine Knochenanfrischung und eine Corticotomie durchgeführt. Die Läsionen heilten ohne weitere Komplikationen oder Verzögerungen aus. Bei einem Patienten zeigte sich eine rezidivierende Fistelung tibialseitig am kaudalen Wundrand. Diese Komplikation wurde in einer weiteren operativen Sitzung durch Exzision des Fistelganges behoben. Bei einem Patienten zeigte sich zwei Tage nach der Primäroperation und einen Tag nach Lappenrevidierung erneut eine venöse Stauung, die in einer dritten Operation behoben werden konnte. Der Lappen erholte sich gut und heilte in der Folgezeit ohne weitere Komplikationen vollständig ein. Bei einem Patienten traten nach bereits guter Einheilung der Spalthauttransplantate nach Entlassung erstmals Defekte in der Spalthaut auf. Alle Defekte heilten nach entsprechender Versorgung kurzfristig ab. Bei einem Patienten trat kurz nach Mobilisierung eine Unterschenkelthrombose und eine Beckenvenenthrombose auf. Der Patient wurde marcumarisiert und die Mobilisierung konnte komplikationslos weitergeführt werden. Alle hier genannten Komplikationen hatten keinen Einfluß mehr auf die postoperative Lappenischämie und wurden deshalb für die Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Entnahmestellen des Musculus latissimus dorsi konnten bei allen Patienten ohne Komplikationen primär verschlossen werden. Bei einem Patienten traten am Tag nach der Operation Schmerzen und eine Verhärtung zentral der Entnahmestelle auf. Die anschließende Sonographie ergab keinen operationswürdigen Befund. Der Patient erholte sich zunehmend und die Schmerzen ließen im Laufe des folgenden Tages nach. Bei einem Patienten traten in der Folgezeit Wundheilungsstörungen im Nahtbereich auf. Bei einem weiteren Patienten trat eine rezidivierende Serombildung im Entnahmeareal ein. Die Stelle wurde wiederholt punktiert und heilte in der Folgezeit ohne Probleme ab.

Tabelle 9: Patientenübersicht

Patient	Lappenart	Ischämie (min)	Komplikationen	Folge
1	FMLD	83	∅	Unterschenkel – und tiefe Beckenvenenthrombose
2	FMLD	139	postoperativ: ~ 10 Stunden post reperf. 1c,2b,3c → Lagerungswechsel dann Besserung ~ 16 Stunden post reperf. Fehlende Durchblutung im Lappen → Re-OP aufgrund Ödem 6 Stunden nach Re-OP 1b,2b,3c → Re-OP (Hämatom um Vene)	Folgeoperationen: Corticotomie nach Lappenhebung, Fibulasegmentresektion, Spongiosaplastik, Lappendébridement
3	FMLD	141	∅	∅
4	FMLD	186	intraoperativ: Torsionsfehler der Vene mit Thrombusbildung → Revision intraoperativ	Folgeoperationen: Débridement und AB-Ketteneinlage, rezidivierende Fistelung tibialer, kaudaler Wundrand
5	FMLD	91	∅	∅
6	FMLD	135	∅	Wundheilungsstörung Entnahmestelle, MRSA-Infektion Folgeoperation: Débridement der Lappenspitze
7	FMLD	130	∅	∅
8	FMLD	143	∅	Serombildung Entnahmestelle Folgeoperation: instabile Narbe, Débridement fibulaseitige oberflächliche Hautnekrose,
9	R	200	intraoperativ: lokale ödematöse Reaktion der Arterie auf Instrumente mit Thrombusbildung → Anastomosenrevision	∅
10	FMLD	250	intraoperativ: arterielle Thrombusbildung → Thrombenentfernung; venöse Stauung durch Druckmanschette	Folgeoperation: Débridement randständige Lappennekrosen
11	FMLD	120	∅	∅
12	FMLD	120	∅	starke Schmerzen Entnahmestelle
13	FMLD	138	∅	∅
14	FMLD	110	∅	∅
15	FMLD	223	intraoperativ: arterielle Thrombusbildung → intraoperative Thrombenentfernung	Folgeoperation: Débridement Hautinsel
16	FMLD	135	postoperativ: ~ 13 Stunden post reperf. 1a,2b,3b → Verbandswechsel ~ 17 Stunden post reperf. 1a,2b,3c → Re-OP	Folgeoperation: 48 Stunden nach Primäroperation 1a,2b,3c → Re-OP
17	FMLD	415	intraoperativ: Leckage in venöser Anastomose → Revision; zweimalige arterielle Thrombusbildung → Thrombenentfernung	Folgeoperationen: Débridement Lappenrandnekrose, Spalthautdefekte
18	FMLD	137	∅	∅
19	FMLD	120	∅	∅

Lappenart: FMLD – freier myokutaner Latissimus dorsi Lappen
R – Radialislappen

post reperf. post reperfusionem

3.2. Operationsdaten

Die mittlere Operationszeit inklusive Patientenlagerung und Verband nach Angaben der Narkoseprotokolle betrug 9 Stunden und 33 Minuten. 17 Patienten wurden postoperativ auf der Verbrennungsintensivstation (23v) behandelt. Ein Patient wurde auf der anästhesiologischen Intensivstation (15i) und ein Patient für 2 Stunden postoperativ im zentralen Aufwachraum überwacht und anschließend auf die Verbrennungsintensivstation zum weiteren Monitoring verlegt.

Tabelle 10: Zeitliche Einordnung

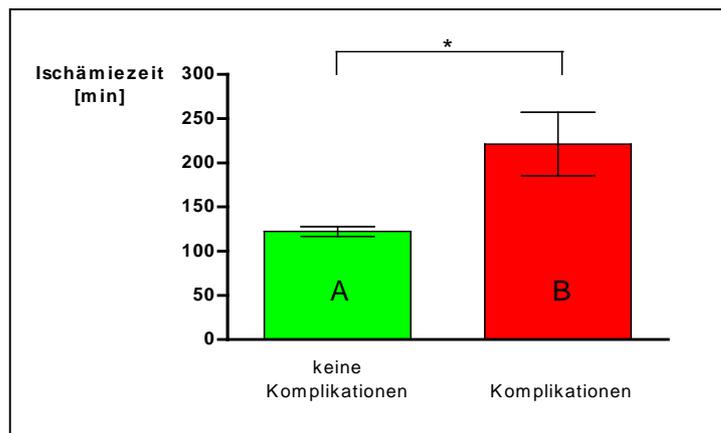
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zeit [d] Trauma - OP	29	4	49	149	15	45	53	33	35	16
OP – Zeit [h:min]	8	9:45	9:25	10:05	10:55	7:45	8:35	7:05	10:55	8:15
Klinikaufenthalt [d]	58	94	41	64	33	54	41	37	32	42

Patient	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Zeit [d] Trauma - OP	7	132	121	26	95	5110	10	48	6
OP – Zeit [h:min]	9:55	6:15	11:30	10:35	10:40	10:35	12:35	9:15	9:20
Klinikaufenthalt [d]	58	27	54	37	51	67	55	43	39

Die Stabilisierung der betroffenen Extremität zum Schutz der Transplantate wurde bei 13 Patienten durch Immobilisation mit einem Fixateur externe, bei 5 Patienten durch eine Hochlagerung in einer Gipsschiene und in einem Fall durch Hochlagerung des Amputationsstumpfes gewährleistet. Die jeweilige Verfahrenswahl wurde aufgrund der Lokalisation und Größe der Defekte und eventuell vorhandener Knochenverletzungen getroffen. Musste die Extremität mit einem Fixateur externe versorgt werden, so wurde dies in allen Fällen von der erstversorgenden Abteilung vor der Lappenversorgung durchgeführt.

Die erreichte mittlere Ischämiezeit betrug 158,74 Minuten. Dabei dauerte die kürzeste Ischämiezeit 83 Minuten und die längste 415 Minuten.

Die Gruppe A (n=12) wies eine mittlere Ischämiezeit von 122,33 Minuten auf. Die mittlere Ischämiezeit der Gruppe B (n=7) betrug 221,14 Minuten (Abbildung 8). Komplikationen während der Operation verlängerten die Ischämiezeit signifikant mit einem P-Wert von unter 0,05 und beinhalteten intra- und postoperative Komplikationen durch die Ausbildung von Gewebeödemen, Hämatomen und Thromben.

Abbildung 8: Ischämiezeiten, * $P < 0,05$ 

3.3. Metabolische Parameter

3.3.1. Glukose

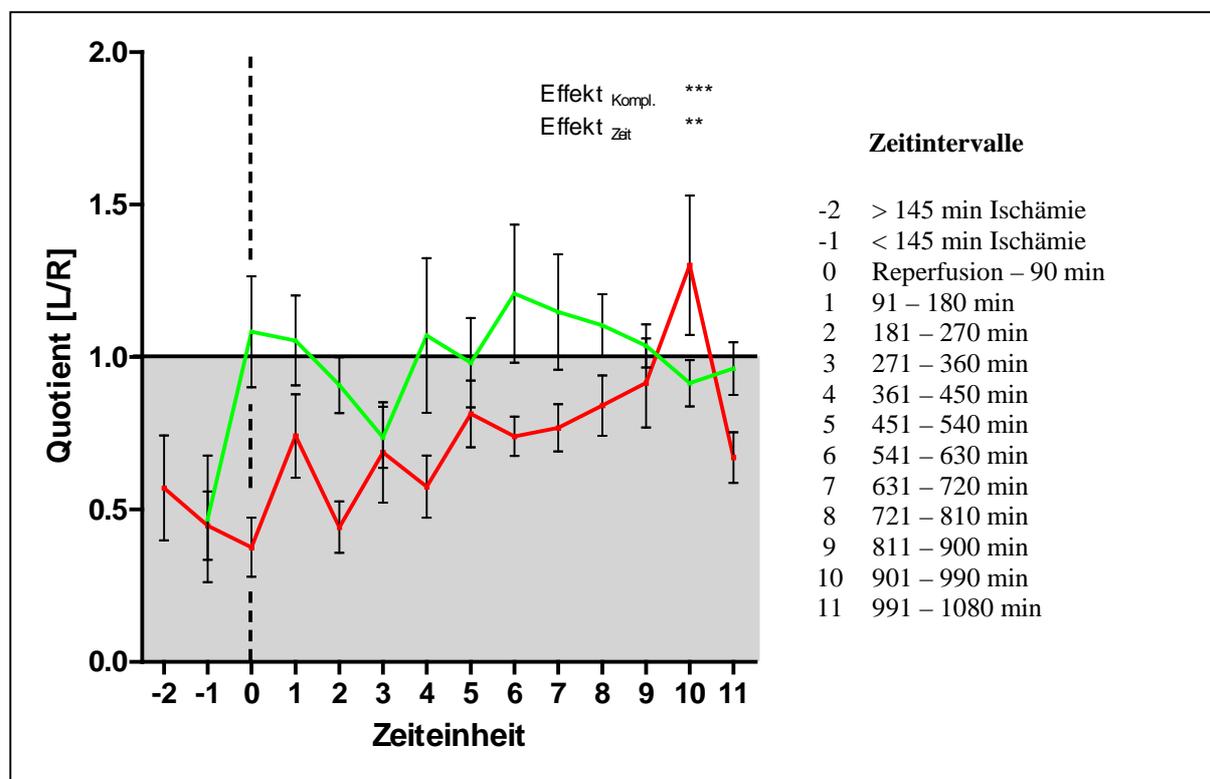
Die Auswertung der Glukosekonzentrationen (Abbildung 9) der Patienten mit Komplikationen ergab einen minimalen Mittelwert von 0,431 für den Zeitraum der ersten 90 Minuten nach Reperfusion und einen maximalen Mittelwert von 1,301 zum Zeitpunkt 901-990 Minuten. Insgesamt ist während der gesamten Monitoringphase eine deutliche tendenzielle Zunahme der Lappenglukosekonzentration zu verzeichnen. Dennoch ist die Konzentration im Referenzgewebe bis 360 Minuten nach Reperfusion um das zweifache erhöht und nähert sich bis 900 Minuten post reperfusionem zunehmend einer gleichen Konzentration in beiden Geweben an, um dann erstmals 990 Minuten nach Reperfusion eine erhöhte Lappenglukosekonzentration aufzuweisen.

Der mittlere Quotient aus Glukosekonzentration im Lappen im Bezug auf die Konzentration im Referenzgewebe der Patienten ohne Komplikationen lagen bei einem minimalen Wert von 0,469 während der Ischämie und einem maximalen Wert von 1,316 im Zeitraum 541 – 630 Minuten post reperfusionem. Direkt nach Reperfusion zeigt sich deutlich eine Verdoppelung der Glukosekonzentration im Lappengewebe von einem Quotienten von etwa 0,5 auf näherungsweise 1,1. Dieses ausgeglichene Verhältnis zwischen Lappen- und Referenzgewebekonzentration bleibt während der gesamten Monitoringphase bestehen.

Es lässt sich zu keinem der gemessenen Zeitintervalle ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A und B feststellen. Die Graphen laufen grundsätzlich parallel mit einer tendenziell höheren Glukosekonzentration in den Lappen der Gruppe A (ohne Komplikationen) als in der Gruppe B (mit Komplikationen). Dennoch kann diese

Nullhypothese (Faktor Komplikation hat keinen Einfluss auf die gemessenen Glukosekonzentrationen) mit einem P-Wert von kleiner 0,0001 widerlegt werden. Die Auswertung zeigte, dass bei einem Experiment dieser Größe nur eine 0,01 prozentige Chance besteht, dass ohne direkten Einfluss des Faktors Komplikation ein ähnliches Ergebnis erzielt werden kann. Es lässt sich für den zeitlichen Verlauf, das heißt für die fortdauernde Reperfusion, eine Entwicklung zugunsten höherer Glukosekonzentrationen im Lappen mit einem P-Wert von 0,0053 erkennen. Die Nullhypothese, dass steigende Reperfusionsdauer keinen Einfluss auf die Höhe der Konzentrationen hat, lässt sich somit widerlegen.

Abbildung 9: Glukose, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation
 *** P < 0,0001, ** P = 0,0053

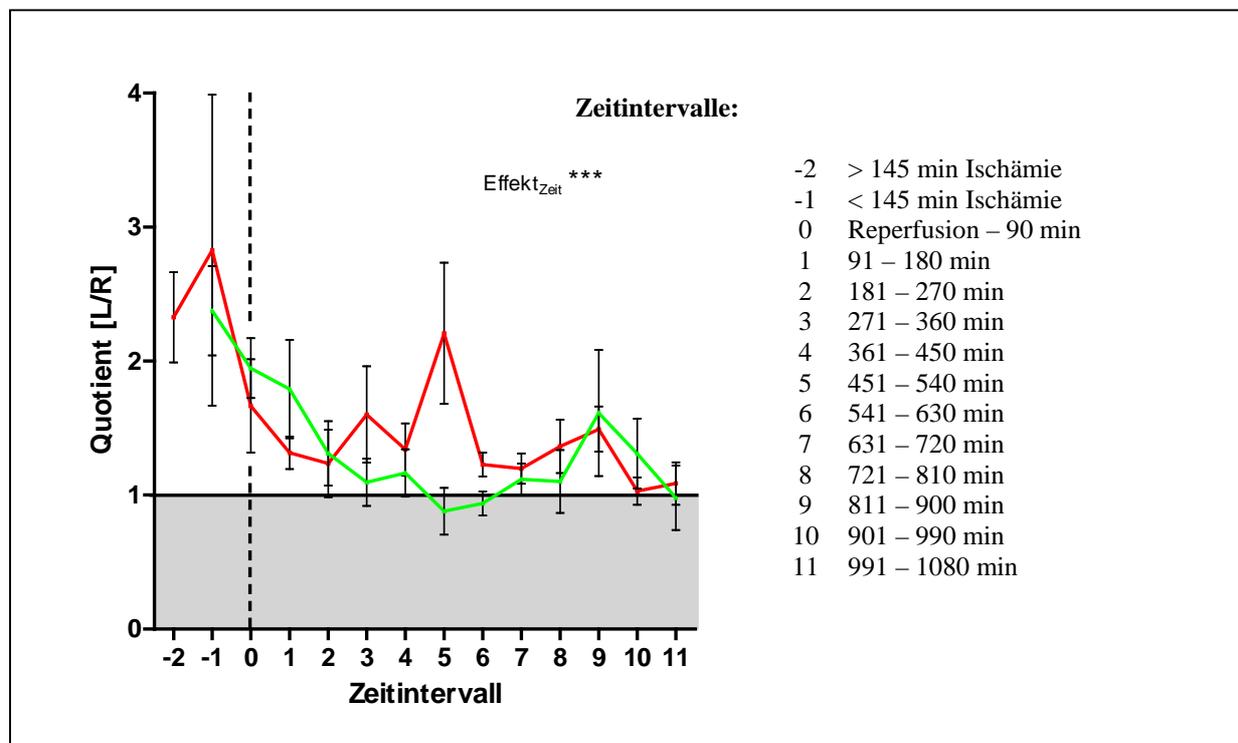


3.3.2. Laktat

Die Verteilung der Quotienten hinsichtlich der Laktatkonzentration (Abbildung 10) in der Gruppe der Komplikationen liegen zwischen dem minimalen Wert 1,031 im Intervall 900 – 990 Minuten und dem maximalen Wert 2,828 von Beginn der Ischämie für die folgenden 145 Minuten. Interessanterweise lässt sich für eine längerdauernde Ischämiezeit keine weitere Erhöhung des Quotienten zugunsten einer erhöhten Lappenlaktatkonzentration feststellen. Insgesamt nähern sich die Werte von Referenz- und Lappengewebe mit andauernder Reperusionszeit einer gleichen Konzentration an. Im Intervall 451 – 540 Minuten lässt sich

kurzzeitig eine erneute Erhöhung der Lappenlaktatkonzentration auf das Doppelte der Referenzkonzentration feststellen und der Quotient steigt auf einen Mittelwert von 2,207 an. Die Werte für die Patienten ohne Komplikationen liegen im Mittel zwischen dem minimalen Wert 0,880 im Intervall 451 – 540 Minuten und dem maximalen Wert 2,376 zum Zeitpunkt der Ischämie. Auch hier lässt sich die annähernde Tendenz zwischen den Konzentrationen im Lappen- und im Referenzgewebe erkennen. Auch hier kommt es, wenn auch zu einem späteren Zeitpunkt 811 – 900 Minuten, zu einem erneuten kurzzeitigen Anstieg der Lappenkonzentrationen ungefähr auf das anderthalbfache der Referenzkonzentration mit einem Quotienten von 1,612.

Abbildung 10: Laktat, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation
*** P = 0,0001



Die statistische Auswertung der Quotienten von Laktatkonzentrationen im Lappen- und im Referenzgewebe ließ zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit Komplikationen und ohne Komplikationen erkennen. Die Graphen sind nahezu parallel und beinhalten keine Tendenzen. Darüber hinaus kann für den Faktor Komplikation kein Effekt auf die Laktatkonzentration erkannt werden und die Nullhypothese, dass dieser Faktor keinen Unterschied zwischen den Laktatkonzentrationen bewirkt, muss angenommen werden. Es besteht die Möglichkeit (Wahrscheinlichkeitsanteil: 28,0 %), dass bei einem ähnlichen Experiment ohne die Unterscheidung in Komplikationen und Nicht-Komplikationen ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Betrachtet man allerdings den zeitlichen

Verlauf der Graphen, so lässt sich eine tendenzielle Reduktion der anfänglich hohen Laktatkonzentrationen im Lappengewebe hin zu ähnlichen Konzentrationen wie das Referenzgewebe erkennen. Die Auswirkung der Reperfusionsdauer auf diese Entwicklung ist mit einem P-Wert von 0,0001 stark signifikant.

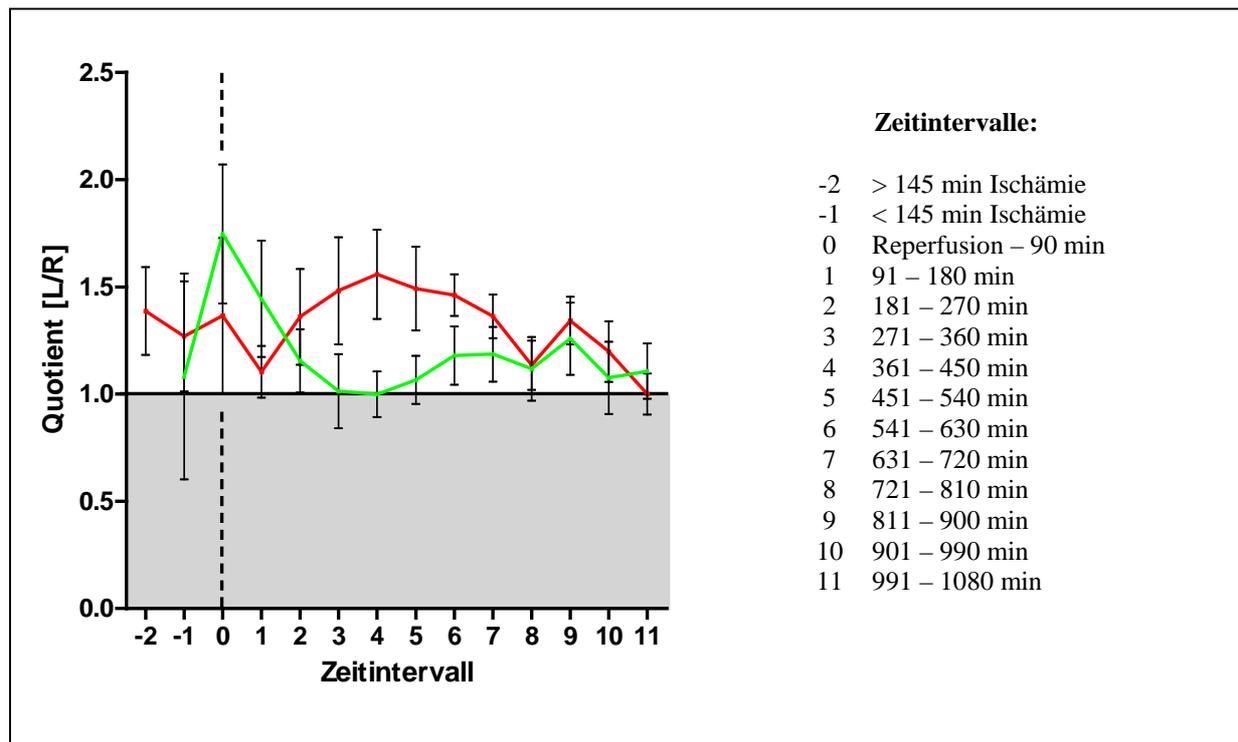
3.3.3. Pyruvat

Die Gruppe der Patienten mit Komplikationen weist bezüglich der Pyruvatkonzentration einen minimalen Quotienten von 1,0 während 991 – 1080 Minuten nach Reperfusion und einen maximalen Wert von 1,558 im Intervall 361 – 450 Minuten post reperfusionem auf. Interessanterweise lässt sich während der gesamten Monitoringphase kaum eine Annäherung der Werte von Lappen- und Referenzkonzentration erkennen. Fast über die gesamte Zeit bleibt die Konzentration im Lappengewebe um das anderthalbfache erhöht. Lediglich zu späten Messzeiten ab 901 Minuten post reperfusionem lässt sich eine Angleichung der Konzentrationen vermuten.

Deutlich wechselhafter verläuft die graphische Darstellung der Ergebnisse der Gruppe mit Patienten ohne Komplikationen während der Lappentransplantation. Der minimale Wert beträgt hier 0,999 zwischen 361 – 450 Minuten nach Reperfusion und der maximale Wert liegt bei 1,747 während der ersten 90 Minuten der Reperfusion. Deutlich zu erkennen ist der sprunghafte Anstieg um 50% von circa 1,1 während der Ischämiephase auf den maximalen Wert während der Reperfusion. Es folgt eine Phase der Konzentrationsangleichung, bis zu dem Zeitpunkt 181 Minuten post reperfusionem die Konzentrationen im Lappen- und im Referenzgewebe ähnliche Werte aufweisen. Jedoch ist eine leichte Tendenz zugunsten höherer Werte im Lappengewebe zu erkennen.

Die statistische Auswertung konnte zu keinem Zeitpunkt des Monitoring einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen A und B detektieren. Darüber hinaus lässt sich kein Einfluß der Faktoren Zeit oder Komplikation auf die Laktatkonzentration erkennen. Mit einer Chance von 10 Prozent lässt sich in einem entsprechenden Experiment ohne den Faktor Komplikation ein ähnliches Ergebnis erzielen. Die Möglichkeit eines gleichartigen Resultates ohne den Faktor Zeit bei identischem Experiment liegt sogar bei 82%. Daher kann in beiden Fällen eine Nullhypothese (kein Einfluss der untersuchten Größen auf das Ergebnis) angenommen werden (Abbildung 11).

Abbildung 11: Pyruvat, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation

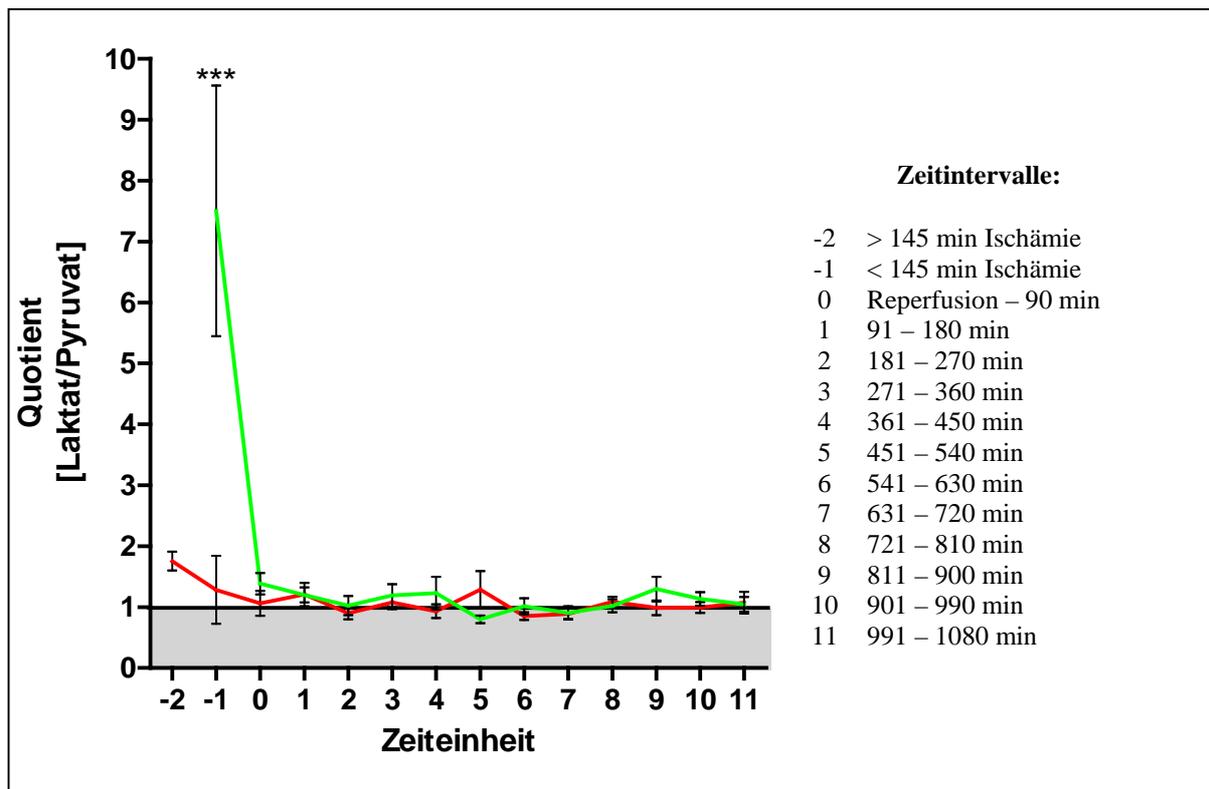


3.3.4. Quotient Laktat / Pyruvat

Der Quotient aus Laktat und Pyruvat wird jeweils aus den Einzelquotienten der beiden Substanzen berechnet.

Die Gruppe mit Komplikationen weist während der gesamten Monitoringphase eine Verteilung der Quotienten um den Wert 1 herum auf. Lediglich in der Phase der Ischämie lässt sich ein maximaler Quotient von 1,6 feststellen. Die Gruppe ohne Komplikationen weist ebenfalls eine Anordnung der Quotienten um den Wert 1 auf. Jedoch ist der Laktat/Pyruvat-Quotient in der Ischämiephase deutlich zugunsten des Laktats verschoben und weist einen Wert 7,5 auf. Interessanterweise ließ die statistische Auswertung also nur zum Zeitpunkt der Ischämie einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppe A und B bezüglich des Quotienten aus Laktat und Pyruvat mit einem $P < 0,001$ zu. Um so überraschender ist jedoch die Tatsache, dass das Verhältnis von Laktat/Pyruvat in der Gruppe der Nichtkomplifikationen völlig unerwartet zugunsten des Laktatwertes verschoben war und die Gruppe der Komplikationen diese Auffälligkeit zu keinem Zeitpunkt der Monitoringphase zeigt (Abbildung 12).

Abbildung 12: Laktat/Pyruvat, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation
 *** P < 0,001



3.3.5. Glycerol

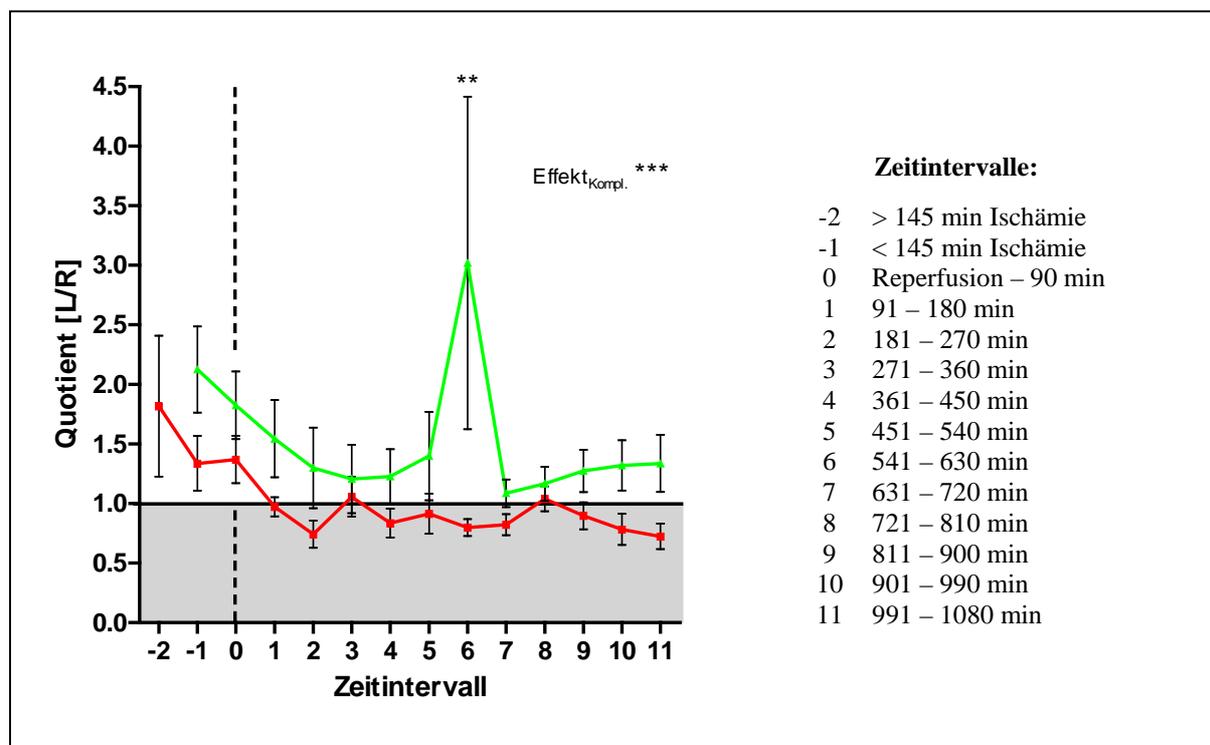
Die Gruppe der Patienten mit Komplikationen weist einen mittleren minimalen Quotienten zwischen Lappen- und Referenzglyzerolkonzentration von 0,723 zum Zeitpunkt 991 – 1080 Minuten post reperfusionem und einen maximalen Wert von 1,818 während der Ischämiezeit länger als 145 Minuten auf. Interessanterweise steigt die Glyzerolkonzentration im Lappen im Gegensatz zur Konzentration im Referenzgewebe mit längerer Ischämiedauer um ungefähr ein Drittel an. Jedoch sind im Verlaufe der Monitoringphase mit längerer Reperfusionsdauer keine signifikanten Unterschiede der Glyzerolkonzentration im Lappen- oder Referenzgewebe zu erkennen. Allerdings lässt sich eine leichte Tendenz zugunsten der Konzentration im Referenzgewebe erkennen, da die Werte sich zwischen 0,75 bis 1,0 befinden.

Erstaunlicherweise bietet die Gruppe mit den komplikationslosen Lappentransplantationen höhere Glyzerolkonzentrationen im Lappengewebe als die Gruppe mit Komplikationen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse der beiden Gruppen A und B lässt grundsätzlich eine parallele Anordnung auf unterschiedlichen Niveaus – mit Ausnahme des Zeitpunktes 541 – 630 Minuten – erkennen. Der minimale mittlere Wert liegt 631 – 720 Minuten nach

Reperfusion bei 1,086. Dagegen findet sich 90 Minuten vorher ein maximaler Wert von 3,020.

Die statistische Auswertung der Daten aus beiden Gruppen A und B lässt nur zum Zeitpunkt 541 – 630 Minuten eine signifikante Erhöhung des Quotienten der Gruppe ohne Komplikationen verglichen mit der Gruppe mit Komplikationen erkennen. Der P-Wert ist kleiner als 0,01. Zu keinem anderen Zeitpunkt sind die Quotienten der beiden Gruppen signifikant voneinander unterschiedlich (Abbildung 13).

Abbildung 13: Glycerol, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation
 *** P = 0,0002, ** P = 0,01



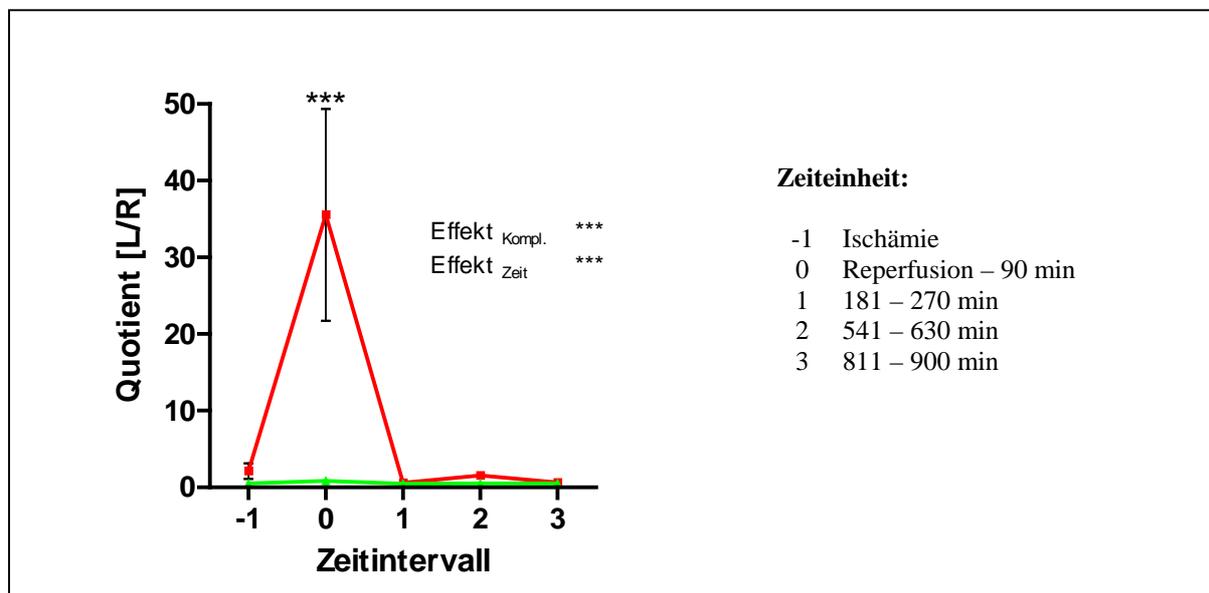
Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufes zeigt keine Signifikanzen. Es ist die Nullhypothese aufzustellen, dass der zeitliche Verlauf (also die andauernde Reperfusionzeit) keinen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse hat. Betrachtete man allerdings den Faktor Komplikation, so beträgt die Signifikanz $P = 0,0002$. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem ähnlichen Experiment ohne diesen Faktor ähnliche Ergebnisse erzielt worden wären, beträgt nur 0,043 Prozent. Somit ist diese Nullhypothese zu verwerfen.

3.4. Immunologische Parameter

3.4.1. C3a

Die bisher gewonnenen Daten der Patienten mit Komplikationen zeigen einen minimalen Quotienten von 0,465 zum Zeitpunkt 181 - 270 Minuten nach der vaskulären Strombahneröffnung und einen maximalen Wert von 35,544 während der ersten Phase der Reperfusion. Dieser deutlich erhöhte Wert ist über 16-fach höher als der nächstgrößte Wert während der Ischämie. Die Werte erreichen in der anschließenden Monitoringphase wieder niedrigere Quotienten. Die restlichen Werte zeigen sich relativ inhomogen mit Quotienten sowohl größer als eins (erhöhte Lappen-C3a-Konzentration) als auch mit Quotienten kleiner als eins (erhöhte Referenz-C3a-Konzentration). Dagegen zeigt sich in der Gruppe mit den Patienten ohne Komplikationen zum gleichen Zeitpunkt der Reperfusion ein maximaler Wert von 0,873 und zum Zeitpunkt der Ischämie ein minimaler Wert von 0,465. Es zeigt sich in dieser Gruppe durchweg eine erhöhte C3a-Konzentration im Referenzgewebe, die bis auf den Zeitpunkt der Reperfusion doppelt so groß ist, wie im Lappengewebe (Abbildung 14).

Abbildung 14: C3a, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation
*** $P < 0,001$



Die statistische Auswertung zeigt zum Zeitpunkt der frühen Reperfusion einen über 30fach erhöhten C3a-Konzentrationsquotienten im Vergleich der Gruppen A und B. Dieses Ergebnis ist hoch signifikant und entspricht einem P-Wert von kleiner 0,001. Zu keinem anderen Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Hinsichtlich des Faktors

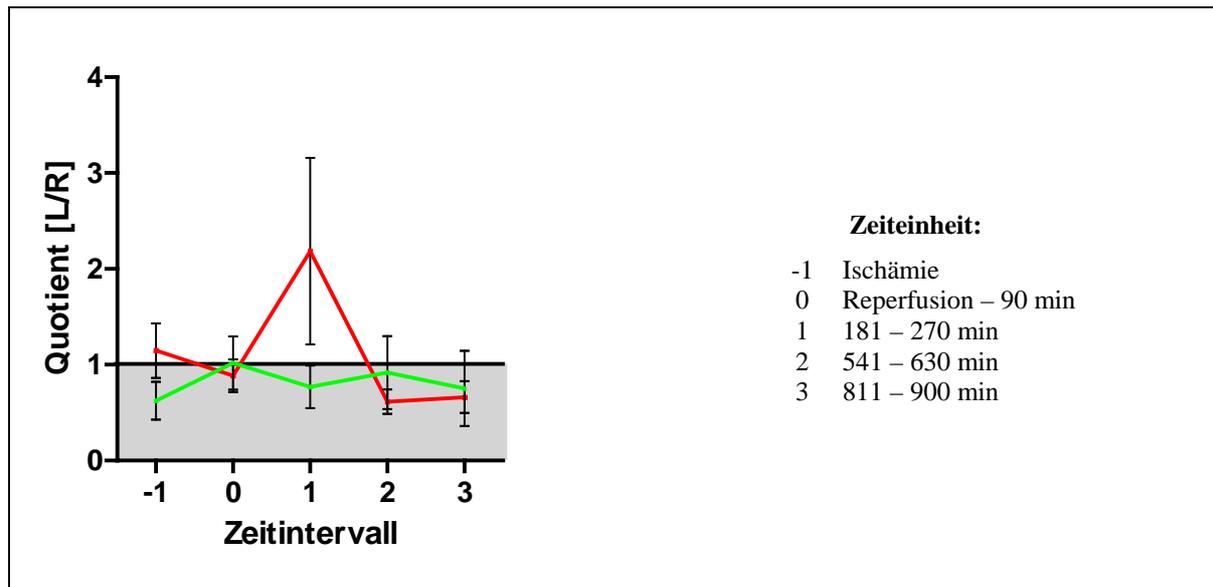
Zeit konnte eine deutliche Auswirkung auf das Ergebnis mit einem P-Wert von kleiner 0,001 gefunden werden. Bezüglich des Faktors Komplikation konnte ebenfalls ein P-Wert von kleiner 0,001 bestimmt werden. So kann für beide Faktoren die Nullhypothese, dass man in einem ähnlichen Experiment ohne diese Einflußgrößen ein gleiches Ergebnis hätte erzielen können, widerlegt werden.

3.4.2. Interleukin-8

Die Quotienten für die Interleukin-8-Konzentrationen der Gruppe B (mit Komplikationen) liegen zwischen dem minimalen Wert 0,614 zum Zeitpunkt 541 Minuten und dem maximalen Wert 2,184 zum Zeitpunkt 210 Minuten. Deutlich zu erkennen ist die zunächst mäßige Erhöhung der Il-8-Konzentration im Lappen während der Ischämie, die kurzfristig zum Zeitpunkt der Reperfusion vermindert ist und im weiteren Verlauf erneut bis auf die doppelte Konzentration im Lappengewebe ansteigt. Jedoch fällt die Konzentration im Lappengewebe von Il-8 im weiteren Monitoringverlauf wieder zugunsten des Referenzgewebes.

Demgegenüber steht die Gruppe der Nicht-Komplikationen. Hier ist während der gesamten Monitoringphase eine erhöhte Konzentration im Referenzgewebe festzustellen. Der minimale Wert liegt in dieser Gruppe bei 0,625 während der Ischämie und der maximale Wert bei 0,917 zum Zeitpunkt 540 Minuten.

Zum Zeitpunkt 210 Minuten kann ein größerer Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Dieser ist jedoch nicht signifikant. Insgesamt betrachtet, haben sowohl der Faktor Zeit als auch der Faktor Komplikation keinen Einfluss auf das Ergebnis. Es besteht im ersten Fall eine Möglichkeit von 33% und im zweiten Fall von 10%, dass bei einem ähnlichen Experiment ohne Einfluß der Faktoren ein gleichwertiges Ergebnis erzielt werden kann (Abbildung 15).

Abbildung 15: Interleukin-8, — Gruppe A, ohne Komplikation, — Gruppe B, mit Komplikation

3.4.3. RANTES

Die Auswertung der Ergebnisse bezüglich RANTES gestaltete sich als schwierig, da nur wenige Messwerte detektiert werden konnten. Diese waren zudem insgesamt breit gestreut. Die Messung dieser Substanz wurde nur bei den ersten Patienten durchgeführt und aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit bei den restlichen Patienten darauf verzichtet. Es können also keine Aussagen bezüglich dieser Substanz und für einen Zusammenhang mit einer verlängerten Ischämiezeit getroffen werden.

4. Diskussion

4.1. Die Mikrodialysetechnik

Die Mikrodialysetechnik hat sich in den letzten Jahren zu einer anerkannten Methode des biochemischen Monitoring verschiedener Gewebe im klinischen Alltag und in der Forschung entwickelt. Dennoch sind bei der Anwendung dieser Technik sowohl Vorteile als auch einige wichtige Einschränkungen zu beachten.

Die MDT ist eine elegante und einfach anzuwendende Technik. Die Katheter sind mit etwas Übung leicht zu platzieren und zu sichern. Sie stellen weder eine bedeutende Bewegungseinschränkung dar, noch ist die Entfernung der Katheter und das Bedienen der Technik direkt am Patientenbett für den Patienten schmerzhaft oder belastend. Durch das mobile Analysegerät können die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Pyruvat, Glycerol, Harnstoff und Glutamat direkt vor Ort analysiert werden. Nach Erkenntnissen dieser Arbeit eignet sich die Technik darüber hinaus auch zur Detektierung von immunologischen Parametern mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa. Allerdings ist die MDT kein „online“-Verfahren. Das heißt, das Dialysat wird zuerst in einem Microvial gesammelt und muss anschließend analysiert werden. Da für jede Konzentrationsbestimmung eine gewisse Probenmenge zur Verfügung stehen muss, sind die erforderlichen Zeitintervalle einzuhalten, um ausreichend Probenvolumen zu erhalten. Die Technik ist zudem auch im operativen Setting unter Zuhilfenahme von sterilen Operationsmaterialien und sterilen Microvials, die direkt vom Hersteller bezogen werden können, einsetzbar.

Die Katheter werden mit Hilfe einer Punktionsnadel in das Gewebe eingebracht. Zum einen wird so das genaue Platzieren des Katheters ohne die Beschädigung der anfälligen Membran möglich. Zum anderen wird die lokale Gewebeerstörung durch die komplikationslose Handhabung deutlich vermindert. Dennoch kommt es besonders in den ersten 30 bis 60 Minuten zu einer lokalen Reaktion auf die Katheterinsertion [54, 81]. Andere Autoren beschreiben eine Beeinflussung des lokalen Zellstoffwechsels während der ersten 120 bis 150 Minuten. Gutierrez et al. bestimmten die Konzentration von Carnosin im Dialysat direkt nach Katheteranlage und fanden in den ersten 150 Minuten erhöhte Werte [46]. Carnosin ist physiologisch in der interstitiellen Flüssigkeit nicht nachweisbar und gilt als Marker für lokale Zellzerstörung. Ob diese minimale Gewebeläsion einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse während der ersten Monitoringphase hat, ist bisher nicht genau geklärt. Minimiert werden kann diese mögliche Beeinflussung durch einen späteren Beginn der Messungen nach Ablauf der 150 Minuten. Andere aber weitestgehend vermeidbare Komplikationen sind:

Verletzung von Blutgefäßen oder Nerven, Beschädigung der empfindlichen Dialysemembran und lokale Hämatombildung. Ist die Kathetermembran intakt, so gibt es keinen direkten Hinweis auf eine umgebende Blutkoagulation. Einige Autoren nehmen an, dass durch ein Hämatom der Gewebefluss direkt um die Membran vermindert wird und somit eine Reduktion aller gemessenen Parameterkonzentrationen zu erwarten ist [138]. Kontrollmessungen im Referenzgewebe sind daher in jedem Falle empfehlenswert.

Die MDT ermöglicht mit Hilfe der Dialysepumpe einen kontinuierlichen Strom der Diffusionsflüssigkeit entlang der Membran. Dies führt zu einer vom Konzentrationsgradienten abhängigen Diffusion, die nicht durch sporadische Veränderungen der Durchflussgeschwindigkeit beeinträchtigt wird. Allerdings ist die Substanzdiffusion von drei Einflussgrößen abhängig: 1. den Eigenschaften des interstitiellen Gewebes, 2. den Substanzeigenschaften und 3. den technischen Eigenschaften der MDT. So kann die Einstellung der Pumpgeschwindigkeit problematisch sein. Das Verhältnis zwischen der Substanzkonzentration im interstitiellen Raum und der höchstmöglich dialysierten Substratkonzentration ist bezeichnet als die „recovery“ [100]. Sie ist abhängig von der Länge der Dialysemembran, dem Katheterdurchmesser und der Pumpgeschwindigkeit, mit der die Dialyseflüssigkeit entlang dieser semipermeablen Membran fließt. Eine maximal niedrige Geschwindigkeit erlaubt eine annähernd 100 prozentige „recovery“. Eine hohe Flussgeschwindigkeit ermöglicht zwar kürzere Messintervalle, führt aber zu einer deutlich geringeren „recovery“. Untersuchungen haben unterschiedliche „optimale“ Pumpgeschwindigkeiten für die jeweils bestmögliche „recovery“ für verschiedene metabolische Parameter ergeben. Es gibt daher Ansätze, bei einer relativ hohen Geschwindigkeit zusätzlich Dextrose oder andere onkotisch wirksame Substanzen in die Dialyseflüssigkeit hinzuzugeben [122]. Um direkt auf die „recovery“ rückschließen zu können, kann ein markiertes Substrat beigefügt und die Konzentrationsänderung dieser markierten Substanz gemessen werden. Rizell et al. konnten auf diese Weise die „recovery“ akkurat bestimmen und direkt Rückschlüsse von der ursprünglich dialysierten Histaminmenge auf die interstitiell tatsächlich vorhandene Histaminkonzentration in verschiedenen Rattengeweben ziehen [118]. Abgesehen von den rein technischen Schwierigkeiten, sind die Substanzeigenschaften bestimmend für die Dialysierbarkeit der interessierenden Substanz. So führen die Diffusionskapazität, Stabilität, molekulare Größe und Aufbau der Substanz sowie ein mögliches Anheften an die Membran oder äußere Katheterwand zu einer Beeinflussung der Diffusion [26]. Die Konzentration der gemessenen Substanz ist nicht nur abhängig von ihrer lokalen Produktion durch Veränderungen des Zellmetabolismus, sondern auch vom

Konzentrationsgradienten zwischen interstitiellem Gewebe und Intravasalraum. Hierbei spielt der lokale Blutfluss, der nicht nur über körpereigene systemische Regulationen beeinflusst wird, sondern auch durch Umgebungstemperatur und pH-Wert der interstitiellen Flüssigkeit eine mitentscheidende Rolle [11, 26]. Experimentelle Studien haben zudem festgestellt, dass Veränderungen im lokalen Blutfluss nicht unbedingt systemisch evident werden müssen [36]. Da die Diffusion der Substanz von vielen bereits oben genannten Faktoren abhängig ist, stellt die gewonnene Konzentration nicht notwendigerweise die tatsächlich vorhandene Konzentration im interstitiellen Gewebe dar [140]. Um dieses Problem zu lösen, wurde beispielsweise eine *in-situ* Kalibrierung für die metabolischen Parameter durchgeführt. Dazu wurden dem Dialysat steigende Konzentrationen der zu monitorierenden Substanz hinzugeführt, bis keine weitere Konzentrationsänderung folgte [80]. Dieses Verfahren verlängert jedoch die Dauer des Experiments und ist klinisch nur eingeschränkt durchführbar. Im Umkehrschluss weisen Veränderungen der Konzentration nicht notwendigerweise auf eine Veränderung des Blutflusses hin und somit stellt die MDT nur ein indirektes Messverfahren für die Durchblutung des untersuchten Gewebes dar.

Anfänglich wurde die MDT eher im Bereich der Neurochirurgie und Neurologie angewandt und konnte speziell für das Monitoring sowohl oberflächlicher als auch schwer zugänglicher zentraler Hirnstrukturen konzipiert werden. Technische Weiterentwicklungen ermöglichen heutzutage nicht nur das Überwachen von peripher gelegenen Muskelabschnitten sondern auch das Monitoring von tiefer gelegenen Muskelanteilen (wie zum Beispiel „buried flaps“). Darüber hinaus ist die MDT – anders als andere Monitoringverfahren – unabhängig vom Vorhandensein von Hautgewebe als Monitoringinsel einsetzbar.

Bei der Verwendung der MDT im klinischen Monitoring und in der experimentellen Forschung gibt es folglich einige Elemente zu beachten. Dennoch ist die MDT eine einfache und unkomplizierte Methode um Substanzen in der interstitiellen Flüssigkeit zu bestimmen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sie bereits in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt wird.

Bisher hat sich die klinische Anwendung der MDT vor allem auf die Analyse verschiedener pathophysiologischer Vorgänge nach Hirntrauma konzentriert [52, 61]. Durch weitreichende Forschungen konnte sogar ein neues Behandlungskonzept für Patienten mit Hirntrauma oder Hirnblutungen in Skandinavien etabliert werden: das „Lund-Konzept“ [101]. In den letzten Jahren konnten darüber hinaus metabolische Vorgänge und ischämische Stoffwechselsituationen in verschiedenen Gewebearten erforscht werden wie Skelettmuskel [46], Herzmuskel [65, 76] und Fettgewebe [13]. Während die Anfänge der Technik also eher

durch die Anwendung im Bereich der Neurochirurgie und Neurologie gekennzeichnet waren, so kann man sie heute in fast allen medizinischen Bereichen finden. Ansätze gibt es beispielsweise in der Intensivmedizin [8], in der Chirurgie [139], in der Transplantationschirurgie [21, 106], in der Plastischen Chirurgie [120] in der Inneren Medizin [32] und in fächerübergreifenden Forschungsfragen [31].

Die MDT bietet also eine vielseitig einsetzbare Alternative zu bisherigen Monitoringverfahren. Dennoch sind die spezifischen Eigenschaften sowohl der Technik selbst als auch des zu untersuchenden Gewebes zu berücksichtigen. Die pathophysiologischen Vorgänge besonders während der Ischämie-Reperfusionphase sind bis heute nicht vollständig verstanden. Gerade deshalb ist die MD eine wichtige Monitoringtechnik, die das klinische Monitoring eines freien Lappens erleichtert und durch biochemische Messwerte ergänzt, gleichwohl aber nicht ersetzen kann.

4.2. Metabolische Parameter

In den vergangenen Jahren hat sich das wissenschaftliche Interesse an den freien mikrovaskulären Gewebetransplantationen gewandelt und sich vom reinen Monitoring der Durchblutung zunehmend auf die Pathophysiologie der Ischämie-Reperfusionvorgänge konzentriert. Die MDT wurde bisher vor allem bei der Analyse von metabolischen Parametern eingesetzt. Die Zusammenhänge zwischen einer ausreichenden Perfusion und damit einer ausreichenden Gewebeversorgung mit Sauerstoff und Glukose sowie die anschließend ablaufenden biochemischen Kaskaden wurden genutzt, um – anhand der Konzentrationsänderungen von Glukose, Laktat, Pyruvat und Glycerol – eine pathologische Änderung der Organperfusion zu detektieren.

Aufgrund des Wechsels vom aeroben Stoffwechsel während der Perfusion und Reperfusion zum anaeroben Stoffwechsel während der Ischämie wurden typische Konzentrationsänderungen der metabolischen Parameter herausgearbeitet. Während der Ischämie sollten die Pyruvat- und Glukosekonzentrationen fallen und die Konzentrationen von Laktat und Glycerol ansteigen. Nach Revaskularisation gleichen sich die gemessenen Werte mit zunehmender Reperusionszeit wieder den präischämischen Werten an [119, 138]. Sollte die Reperfusion gefäßbedingt (arteriell oder venös) oder durch ein Gewebehämatom gestört sein, resultiert daraus eine verlängerte Ischämiezeit. Dies zeigt sich im Monitoring in einem ausgeprägten Abfall der Glukosekonzentration und einem Ansteigen der Glycerol- und Laktatkonzentration. Nach Beseitigung der Okklusion kommt es zu einem Annähern der präischämischen Konzentrationswerte, wobei diese Annäherung mit ansteigender

Ischämiezeit deutlich langsamer verläuft. [121] Ein solches Konzentrationsmuster konnte in den Kontrollgeweben zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

Die in unserer Studie gewonnenen Daten zum Metabolismus unterstützen diese bisher gewonnenen Erkenntnisse nicht in allen Punkten. Allerdings ließ sich aufgrund der klinisch-operativen Gegebenheiten nur eine kurze Äquilibrationsphase der Katheter realisieren und es konnten keine Proben zum Vergleich der Grundumsätze vor Ischämiebeginn gewonnen werden. Des Weiteren wurden die Mikrodialyseproben sofort tiefgefroren und speziell für die Nachweisreaktionen langsam aufgetaut. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass per se ein Unterschied im Grundumsatz im Kontroll- und Lappengewebe bestand, die Katheter unterschiedliche „recovery“ aufwiesen und Substrat während des Einfrierens/Auftauens zerstört wurde.

4.2.1. Glukose

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Glukosekonzentrationen im Lappen in der Ischämiephase deutlich geringer waren als im normal perfundierten Referenzgewebe. Sofort nach Eröffnung der Gefäßversorgung glichen sich die Konzentrationen dem Quotientenwert 1 an, was einem Äquilibrium zwischen Lappen- und Kontrollgewebe entspricht. Von Anfang an ließ sich bei den Patienten mit Komplikationen im Lappengewebe ein niedrigerer Ausgangsglukosewert während der Ischämie erkennen. Die Erhöhung der Lappenglukosekonzentration auf das Niveau des Referenzgewebes geschah stetig, dennoch deutlich langsamer als in der Gruppe ohne Komplikationen. Die grafische Darstellung beider Gruppen im Monitoringverlauf zeigt weiterhin eine deutlich parallele Entwicklung, wobei die Gruppe der Komplikationen tendenziell niedrigere Werte aufweist. Dennoch ließen sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die niedrige Glukosekonzentration während der Ischämiezeit und die stetige Erhöhung der Konzentration im Verlauf der Reperfusion lassen sich auf die erfolgreiche Blutversorgung des Lappengewebes zurückzuführen. Andere Forschungsgruppen konnten vergleichbare Ergebnisse zeigen und dokumentieren, dass eine Verminderung der Perfusion zu einer Verminderung der Glukoseversorgung führt [71, 120].

Es konnte unter Verwendung des Doppler-Ultraschalls gezeigt werden, dass nach einer freien Gewebetransplantation der Blutfluss sowohl im Empfängergebiet als auch in den Blutgefäßen des freien Lappens erhöht ist. Die Autoren führen dies auf einen möglicherweise vorliegenden Verlust des Gefäßtonus und verminderten Gefäßwiderstand zurück [82]. Inwieweit sich

verschiedene Komplikationen während der freien Gewebetransplantation unterschiedlich auf dieses Phänomen auswirken, bleibt zum derzeitigen Zeitpunkt unklar.

4.2.2. Laktat

Eine erhöhte Laktatkonzentration im systemischen Blutkreislauf präsentiert das Verhältnis zwischen der Laktatproduktion und dem Verbrauch durch Gewebe und Organe und stellt nur einen Gesamtüberblick über dieses Verhältnis dar [17]. Um eine bessere Aussage über die tatsächliche intramuskuläre Laktatproduktion treffen zu können, muss die Laktatkonzentration direkt vor Ort gemessen werden. Wir haben auch zu diesem Zweck die Mikrodialysetechnik genutzt. Die Laktatkonzentrationen sowohl bei Patienten mit Komplikationen, als auch bei Patienten ohne Komplikationen zeigten deutlich höhere Werte im Lappengewebe während der Ischämiezeit und eine Verminderung ab Reperfusionbeginn. Diese Entwicklung zeigen auch andere Studien [64]. Traten keine Komplikationen auf, so erreichte die Lappenlaktatkonzentration etwa nach 3 Stunden das Niveau des Referenzgewebes. Dies konnte für die Gruppe mit den Komplikationen nicht gezeigt werden. Hier verläuft die postischämische Phase deutlich unruhiger und zeigt während der gesamten Monitoringdauer eine tendenziell erhöhte Konzentration im Lappengewebe. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Studien [71, 138]. Darüber hinaus weißt die grafische Darstellung einen signifikanten Anstieg nach 7,5 – 9 Stunden und einen weiteren leichten Anstieg der Laktatkonzentration im Lappengewebe nach 13,5 – 15 Stunden auf. Dieser kleinere Anstieg der Laktatkonzentration tritt zur gleichen Zeit ebenfalls in der komplikationsfreien Gruppe auf. Dieser Zeitpunkt ist konsistent mit dem Verbandwechsel, der am nächsten Morgen auf der Station durchgeführt worden ist. Es lässt sich also vermuten, dass eine lokale Irritation und Untersuchung des Lappengewebes sowie eine Affektion des Muskelgewebes während des Verbandwechsels zu einem Ansteigen der Laktatkonzentration führt. Eine Beeinträchtigung der Lappenperfusion tritt offensichtlich nicht ein, denn die Glukosekonzentrationen ändern sich zu diesem Zeitpunkt nicht. Es ist daher zu vermuten, dass die erhöhte Laktatkonzentration auf ein erhöhtes Ausschwemmen aufgrund von mechanischen Manipulationen im Rahmen der Verbandwechsel zurückzuführen ist. Die kurzfristige Konzentrationserhöhung in der Komplikationsgruppe nach 9 Stunden lässt sich nicht mit einem von außen wirkenden Vorgang erklären. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass es neben der hypoxisch bedingten Laktatproduktion noch andere Mechanismen zur Steigerung der Laktatkonzentration gibt, wie zum Beispiel die β -adrenerge Stimulation der Glykogenolyse im Muskel [18, 133].

Wir stellten fest, dass die Laktatkonzentrationen innerhalb beider Gruppen Streuungen aufwiesen und unsere Ergebnisse de facto keinen Unterschied zwischen den Laktatkonzentrationen in der Gruppe der Komplikationen und der Nicht-Komplikationen zeigten. Eben diese Variabilität der Laktatkonzentrationen innerhalb einer Patientengruppe führte zur Anwendung des Laktat/Pyruvat-Quotienten, da die Höhe des einzelnen Laktatwertes keinen prognostischen Schluss auf die Stoffwechsel des Gewebes zulässt, sondern nur in Kombination mit den restlichen Werten beziehungsweise der Konzentrationsentwicklung zu sehen ist [138]. Rjödmark et al. stellten fest, dass Muskelgewebe deutlich schneller auf Veränderungen des anaeroben zum aeroben Stoffwechsel und umgekehrt reagiert [121]. Dies könnte womöglich auf einen schnelleren Metabolismus zurückzuführen sein. Es wäre demnach möglich, dass die Messintervalle in unserer Studie besonders unmittelbar nach Reperfusion mit 90 Minuten zu lang waren und somit schnelle Veränderungen der Laktatkonzentration nicht erfasst worden sind. Des Weiteren stellten bereits Udesen et al. fest, dass die Konzentrationslevel alleine anscheinend keinen direkten Schluss auf mögliche Komplikationen zulassen, obwohl die Laktatkonzentration abhängig vom Glukoseangebot und der Stoffwechselsituation ist [138].

4.2.3. Pyruvat

Unsere Studie konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Bezug auf Pyruvat nachweisen. Tendenziell sind die Pyruvatlappenkonzentrationen in der Komplikationsgruppe sowohl in der Ischämiephase als auch bis drei Stunden nach Reperfusion niedriger als in der Gruppe der Nichtkomplaktionen. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Konzentrationen des Lappen- und des Kontrollgewebes in der Gruppe der Nichtkomplaktionen einem gleichen Niveau an, während sie in der Komplikationsgruppe im Lappengewebe bis auf das anderthalbfache erhöht bleiben. Interessanterweise sind diese Ergebnisse in der Patientengruppe ohne Komplikationen nahezu konträr zu bisher veröffentlichten Studien. Rjödmark et al. beschrieben eine deutliche Verminderung der Pyruvatkonzentration während der Ischämie mit einem erneuten Anstieg direkt nach Reperfusion über den präoperativen Ausgangswert hinaus [121].

4.2.4. Quotient Laktat / Pyruvat

Wie bereits oben dargestellt, eignet sich die Höhe der Laktatkonzentration nicht als prognostischer Faktor. Die Bildung des Quotienten aus Laktat und Pyruvat [L/P] ermöglicht jedoch eine genauere Aussage über den Redoxstatus der Zelle und scheint unempfindlicher auf andere systemische Einwirkungen zu sein [70]. Enblad et al. beschreiben den [L/P] als

den Ischämie marker mit der höchsten Spezifität und einer sehr hohen Sensitivität [34, 35]. Wobei es bei der Beurteilung des [L/P] zu beachten gilt, dass eine partielle Ischämie wahrscheinlich eher zu einer Veränderung des Pyruvatwertes ohne Beeinträchtigung des Redoxstatus führt und es bei einer absoluten Ischämie zu einer Veränderung der Zellsituation mit Veränderung des [L/P] kommt [16]. Der Redoxstatus beeinflusst sowohl die Glykolyse, Laktatoxidation, Pyruvatoxidation und den Zitratzyklus [17]. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich erhöhte Laktat/Pyruvat-Quotientenwerte während der Ischämiezeit in beiden Gruppen. Interessanterweise ist dabei der Wert in der Gruppe der Nichtkomplifikationen circa 5fach höher ($P < 0,001$) als in der Gruppe mit Komplifikationen. Dieses Ergebnis ist konträr zu bisher veröffentlichten Studienergebnissen. Sofort nach Perfusion des Gewebes nähern sich die Werte in beiden Gruppen dem Wert 1 an. Dies bedeutet, dass im Lappen – und Kontrollgewebe ähnliche Quotienten von Laktat und Pyruvat vorliegen. Es konnten in dieser Phase keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden, auch wenn die Angleichung der Werte in der Gruppe der Nichtkomplifikationen tendenziell gleichmäßiger verläuft. Andere Studien hier konnten ähnliche Ergebnisse aufweisen [9, 33, 70].

4.2.5. Glycerol

Die eindeutige Interpretation der Glycerollevel trifft unserer Meinung nach auf einige Schwierigkeiten. Wenn in einer ischämischen Situation die Sauerstoff- und Glukoseversorgung des Gewebes nicht ausreicht, wird dieses vom anaeroben Stoffwechsel abhängig. Sollte nun die Energiegewinnung für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels nicht genügen, vermindert sich die Zellfunktion und im weiteren Verlauf tritt der Tod der Zelle ein. Die in der Zellmembran enthaltenen Phospholipide werden durch eine Phospholipase zu Glycerol hydrolysiert und somit steigt die interstitielle Konzentration von Glycerol an. Die bisher veröffentlichten Studien sprechen für eine schnelle Affektion der Zelle mit einer annähernd sofortigen Erhöhung der Glycerolkonzentration und einer schnellen Erniedrigung der Werte nach Reperfusion innerhalb weniger Stunden [121, 138]. Navegantes und Kollegen stellten in ihrer Studie fest, dass die Glycerolverwertung in unterschiedlichen Muskelgruppen unterschiedlich hoch ist, dabei allerdings bei systemischer Applikation von Insulin geringer beeinflussbar ist, als Fettgewebe [102]. Es lässt sich allerdings nicht feststellen, wie groß die Unterschiede zwischen den verschiedenen Muskelgruppen sind. Wir können somit nicht mit Sicherheit eine von vornherein unterschiedliche Ausgangskonzentration in den Referenz- und Lappengeweben ausschließen. Wie bereits

Hagstrom-Toft et al. feststellten, ist die Konzentration dieser Substanz darüber hinaus vom Fettgehalt und der Art des Gewebes abhängig [47]. Dies könnte entweder aus einem per se höheren Glycerolgehalt im interstitiellen Gewebe oder aus den massiv freigesetzten Konzentrationen während des Operationstraumas resultieren. Mit Sicherheit spielt die direkte Freisetzung während der chirurgischen Freilegung und Hebung des Lappens eine Rolle. Dies würde zu einer erhöhten Glycerolkonzentration im Lappengewebe führen, während die Referenzgewebekonzentration stabil bleibt. Eine weitere Einflussgröße auf den Glycerolwert ist die Operation als Stresssituation für den Patienten. Dieser Stress führt zu einer Erhöhung des Sympathikotonus und somit konsekutiv zu einer erhöhten Lipolyse [37, 38]. Dies wiederum erhöht die Glycerolkonzentration im interstitiellen Gewebe. Hierbei müsste diese Konzentrationserhöhung sowohl im Lappen- als auch im Kontrollgewebe zu detektieren sein. Neben dieser systemischen Aktivierung der Lipolyse beschrieben Dodt und Kollegen eine Lipolyse durch Stimulation des sympathischen Neurons über β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren [31]. Enoksson et al. veröffentlichten Ergebnisse, die zeigen, dass es bei einer lokalen Dilatation der Blutgefäße und gleichzeitiger Stimulation der Lipolyse zu einem verstärkten Verlust von Ethanol und zu einer Steigerung der Glycerolkonzentration in der Mikrodiälyseflüssigkeit kommt [36]. Der Ethanolverlust aus der Monitoringflüssigkeit impliziert die Steigerung des lokalen Blutflusses. Allerdings kam es in der Anfangsphase des Experimentes nur zu einer Verluststeigerung, während die Glycerolkonzentrationen trotz vermehrter Lipolyse nicht anstiegen. Enoksson et al. führten dies auf eine sofortige Reaktion des Gefäßsystems und schnelle Veränderung des Blutflusses bei gleichzeitig langsamerer Stimulation der Lipolyse und somit langsamerer Glycerolfreisetzung zurück.

Unsere Ergebnisse zeigten Glycerolkonzentrationen während der Ischämiephase, die in beiden Gruppen in den Lappengeweben bis auf das Doppelte im Gegensatz zum Kontrollgewebe erhöht waren. Im Laufe der Reperfusion fallen die Glycerolwerte bis auf ein dem Referenzgewebe ähnliches Niveau und die Quotienten erreichen einen Wert nahe 1. Soweit ist die Beobachtung konsistent mit den bisher beschriebenen Arbeiten [33, 138]. Jedoch finden sich tendenziell höhere Glycerollappenkonzentrationen in der Gruppe der Patienten ohne Komplikationen sowohl in der Ischämiephase als auch in der folgenden Perfusion. Diese Beobachtung ist interessant, denn bisher wurde berichtet, dass bei ischämischen Muskelgeweben nach erfolgloser Reperfusion die Glycerolkonzentrationen erhöht bleiben oder sogar stetig ansteigen, nicht jedoch bei perfundiertem Gewebe. Udesen et al. beschreiben sogar Richtwerte, ab denen eine Re-OP in Betracht gezogen werden sollte [138]. Dieser Wert liegt bei 1500 $\mu\text{mol/l}$ und wurde in unserer Studie in keiner der beiden

Gruppen erreicht. Es ist daher fraglich, ob die Entscheidung für das weitere Procedere tatsächlich von Konzentrationswerten abhängig gemacht werden sollte. Die Werte der komplikationsfreien Gruppe waren jedoch nicht signifikant, sondern nur tendenziell höher als in der Gruppe mit Komplikationen. Insgesamt waren die Komplikationen nicht schwerwiegend genug, um eine massive Zytolyse und damit eine stark erhöhte Glycerolfreisetzung auf obengenanntes Niveau erwarten zu lassen. Hinzu kommt die massive Glycerolwerterhöhung in der Gruppe der Nichtkomplikationen zum Zeitpunkt 9-11,5 Stunden, die wir nicht mit einem Einwirken äußerer Faktoren erklären können.

4.3. Immunologische Parameter

Es ist bekannt, dass Wundsekret und Blut, welches direkt aus einer chirurgischen Wunde entnommen worden ist, erhöhte Konzentrationen von Komplementspaltprodukten und Zytokinen enthalten [58]. Wir konnten erstmals mit unserer Studie zeigen, dass immunologische Parameter wie C3a und Interleukin-8 mit der Mikrodialysetechnik messbar sind und deshalb lokale Regulationsvorgänge in direkten Zusammenhang mit dem Ischämie-Reperfuionsverlauf zu bringen sind.

4.3.1. C3a

Unsere Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den C3a-Konzentrationen der beiden Gruppen während der Ischämie und direkt in den ersten 90 Minuten nach Reperfusion. Die C3a-Werte sind in der Nichtkomplikationsgruppe im Kontrollgewebe und im Lappengewebe zu allen gemessenen Zeitpunkten ähnlich und eine Veränderung lässt sich während des Reperfuionsvorganges nicht erkennen. Demgegenüber steht die Gruppe der Komplikationen. Sie weist bereits während der Ischämie einen rund dreifach erhöhten Wert im Lappengewebe auf. Dieser Unterschied erhöht sich auf das über 30-fache in der ersten Reperfuionsphase. Im weiteren Verlauf nähern sich die Konzentrationen in den unterschiedlichen Geweben einem gleichen Niveau an. Wir konnten in unserer Studie erstmalig mit Hilfe der Mikrodialysetechnik ein Komplementspaltprodukt dialysieren und nachweisen.

In diversen klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Komplementsystem bei Ischämie-Reperfuionsvorgängen wie zum Beispiel beim Myokardinfarkt [84, 96] und bei Patienten mit partieller Hepatektomie [134] aktiviert wird und verschiedene Spaltprodukte nachweislich messbar waren [5]. Bengtson et al. zeigten, dass im Serum von Patienten mit akuter und chronischer arterieller Ischämie in der unteren Extremität sowohl prä- als auch bis

zu einer Woche postoperativ erhöhte C3a – und C5a – Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Dabei waren die Konzentrationen bei den Patienten mit akuten Ischämien gegenüber chronischer Mangelversorgung deutlich erhöht [10]. Ähnliches konnte für ischämische Hirnverletzungen gezeigt werden. Die Anzahl der Rezeptoren für sowohl C3a als auch C5a war postischämisch an Blutgefäß-Endothelzellen, Makrophagen und reaktiven Astrozytenzellen erhöht [141]. Im Serum von Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnte eine erhöhte Komplementaktivierung nachgewiesen werden [148]. Del Conde et al zeigten, dass aktivierte Thrombozyten über einen teilweise P-Selektin-abhängigen Prozess zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen [29]. Die Autoren fanden heraus, dass die Komplementaktivierung bis hin zur Ausbildung des C5b-9-Komplexes (Membran attackierender Faktor = MAC) führte. Demnach kann eine kapillare Thrombosierung – wie sie für Ischämie-Reperfusionsschäden mit verantwortlich gemacht wird – zu einer vollständigen Aktivierung des Komplementsystems führen. Auf der anderen Seite führt eine Aktivierung von Komplementfaktoren wie C3a, C5a und MAC zu einer Formation des Plättchen-aktivierenden-Faktors (PAF) [85]. PAF ist ein Entzündungsmediator und spielt eine Rolle in der Entstehung von Herzinfarkten und der Rekrutierung von Leukozyten [97]. Dieses sind Zusammenhänge, die möglicherweise eine Beobachtung von Machens et al. erklären könnten. Sie beschrieben eine erhöhte C3a-Konzentration im verbrannten Gewebe im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe. Ältere Patienten zeigten dabei signifikant höhere Werte als jüngere Patienten und wiesen nach 36 und 48 Stunden signifikant mehr thrombosierte subdermale Gefäße auf [87]. Die Verbindungen des Komplementsystems und des Gerinnungssystem erscheinen vielfältig. So kontrolliert die Carboxypeptidase R (CPR) einerseits Entzündungsreaktionen durch die Inaktivierung von Komplementanaphylatoxinen wie C3a und C5a. Andererseits inhibiert es über die Unterbrechung der Bindung von Plasminogen an Fibrin die Fibrinolyse. Sollte es also über eine Aktivierung des Komplementsystems zu einer Hochregulation des CPR kommen, besteht gleichzeitig die Gefahr einer Thrombosierung und weitreichender klinischer Notfallsituationen wie die disseminierte intravasale Gerinnung [20]. Andererseits konnte von Cheung et al. gezeigt werden, dass *in vitro* nach Applikation von hohen Heparindosen (2,0 U/ml) die Konzentration von C3a(desArg) geringer war, als nach Applikation von niedrigen Dosen. Die Autoren führen dies entweder auf einen inhibitorischen Effekt von Heparin auf das Komplementsystem oder auf eine – von Heparin unterdrückte – Stimulation desselben durch die Koagulation zurück [24]. May und Kollegen haben bereits 1977 das „no-Reflow“-Phänomen beschrieben als einen Vorgang, der nach längerer globaler Ischämie nach

Wiederherstellung der Perfusion ohne erkennbare Anastomosenkomplikation zu einer Obstruktion des Blutflusses führt [92]. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass es während des Ischämie-Reperfusionsvorganges zu einem verminderten Kapillardurchfluss, Ausbildung eines Gewebeödems, Endothelzellschwellung und Bildung von Sauerstoffmetaboliten kommt [42, 94]. C3a konnte als potenter Aktivator für sogenannte „reactive oxygen species“ (ROS) ermittelt werden. ROS führen zu oxidativem Stress und DNA-Fragmentation und somit zu einer Aktivierung der Apoptose und zu Gewebeuntergang [25]. Darüber hinaus kommt es vor allem bei kleinen Gefäßen zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität [110]. C3a ist bei der Aktivierung von Gewebemastzellen beteiligt. Diese Zellen führen zu einer Histaminausschüttung. Histamin wiederum scheint eine nicht unwesentliche Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten einzunehmen [45]. Eine erhöhte C3a-Konzentration könnte somit Ausdruck einer vermehrten Beeinträchtigung des lokalen Blutflusses auf Kapillarebene sein und einen Ansatz zur Erklärung des „No-Reflow“-Phänomens bieten.

C3a und C3a(desArg) greifen über eine Stimulation von Hypophysenhormonen aktiv in die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ein und wirken somit als Modulator endokriner Reaktionen welche zum einen eine zentrale Rolle bei der Stressbewältigung des humanen Organismus spielen und zum anderen inflammatorische Reaktionen beeinflussen [41]. Da ein chirurgischer Eingriff als eine akute Stresssituation zu werten ist, könnte diese zu einer spontanen Erhöhung von C3a führen. Dies würde zu einer Erhöhung der C3a-Konzentrationen sowohl im Lappen – als auch im Kontrollgewebe nach der Reperfusion führen, während sie in der Ischämiezeit im Lappengewebe erniedrigt (durch die Abgrenzung vom systemischen Kreislauf) und im Kontrollgewebe erhöht sein müßte. C3a wird auf drei Wegen aktiviert. Indirekt kommt es zu einer C3a-Produktion über den klassischen Weg (Abbildung 3). Hierbei muss die gesamte Komplementkaskade über die Initialreaktion von C1 durchlaufen werden. Bei der Aktivierung über den Lektinweg findet sowohl eine indirekte (ebenfalls über eine Aktivierung von C1) als auch wahrscheinlich eine direkte Aktivierung statt. Diese wird möglicherweise über eine bisher weitestgehend unbekannte Protease MASP (Mannan-binding-lectin associated serine protease) durchgeführt, von der es zwei Formen gibt. MASP1 führt zumindestens *in vitro* zu einer direkten Aktivierung von C3 mit Bildung von C3a. Anders verhält sich die Anregung der C3a-Produktion über den alternativen Weg, der sowohl antikörperabhängig als auch – unabhängig verlaufen kann. Hier kann es darüber hinaus zu einer kontinuierlichen spontanen Aktivierung kommen. Sowohl C1r, C1s als auch MASP-1 und MASP-2 weisen größere Molekulargewichte als 20kDa auf (77-88kDa) und

werden somit durch die Mikrodialysetechnik nicht erfasst [131]. Da C3 durch sein hohes Molekulargewicht von 187 kDa ebenfalls nicht mehr dialysiert werden kann, lässt sich nach erfolgter Dialyse eine Aktivierung von Zwischenprodukten und C3a über den alternativen Weg ausschließen.

4.3.2. Interleukin-8

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es zu einer erhöhten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF, IFN, IL-1, IL-6, IL-8) nach Ischämie-Reperfusionsvorgängen in Niere [75], Leber [144], Herz [109], Darm [23] und Lunge [129] kommt. Il-8 hat in erster Linie proinflammatorische und prokoagulative Eigenschaften und führt zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Aktivierte neutrophile Granulozyten werden neben anderen Faktoren als Mediator für Ischämie-Reperfusionsschäden angesehen. Dabei wirken sie wahrscheinlich am ehesten auf postkapilläre Venolen [108]. Dennoch sind die bisherigen Daten für Il-8 nicht eindeutig und eine Beteiligung an Ischämie-Reperusionsprozessen nicht sicher belegbar. Erhöhte Konzentrationen bei Patienten mit akuten Herzinfarkten konnten gemessen werden [114]. Dennoch bestehen zahlreiche Überlappungen mit Patienten ohne akute Geschehen und eine Erhöhung von Il-8 ist somit nicht als Marker für ein akutes kardiales Ereignis zu verwenden [55]. Auch Kim et al. konnten keine signifikanten Il-8-Erhöhungen während des Ischämie-Reperfusionsvorganges bei Leberresektionen feststellen [68]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Kubala und Kollegen, die erhöhte Il-8-Konzentrationen in der frühen Reperusionsphase nach Herztransplantation und darüber hinaus bei Patienten mit kardialen Eingriffen ohne Transplantation nachweisen konnten [73]. Xu und Kollegen konnten zeigen, dass Hypoxie in soliden Ovarialkarzinomen über verschiedene Reaktionskaskaden zu einer erhöhten Il-8-mRNA-Expression führt [147]. De Perrot et al. verwiesen in ihrer Studie nicht nur auf die Il-8-Konzentrationserhöhung nach Reperfusion bei Lungentransplantation, sondern sogar auf die Korrelation zwischen der Größe der Konzentrationszunahme zwei Stunden post reparationem und der Länge der notwendigen intensivmedizinischen Betreuung [28]. Ähnliches konnten auch bei Lebertransplantationen beschrieben werden [99]. Hirani et al. beschrieben eine Hochregulation von Il-8-mRNA (innerhalb 30 Minuten) und Il-8-Konzentration (innerhalb zwei Stunden) in Makrophagen durch Hypoxie. Darüber hinaus zeigten sie eine gesteigerte Konzentration bei Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) [57].

Unsere Daten konnten ebenfalls keinen signifikanten Hinweis auf eine Beteiligung von Il-8 an Reperfusionsschäden im Muskelgewebe geben. Wobei nicht auszuschließen ist, dass deutlich längere Ischämiezeiten mit massiver Gewebeschädigung nötig sind, um eine signifikante Erhöhung von Il-8 zu bewirken. Denn interessanterweise waren die Il-8-Konzentrationen des Lappengewebes in der Gruppe der Nichtkomplikationen tendenziell niedriger als das Kontrollgewebe. In der Komplikationsgruppe dagegen fanden sich tendenziell höhere Werte im Lappengewebe, wobei zum Zeitpunkt 3,5 Stunden nach Reperfusion ein deutlicher Unterschied bestand. Hier erhöhten sich die Werte im Lappengewebe etwa auf das 2-fache im Vergleich zum Referenzgewebe. Wir konnten erstmals nachweisen, dass Il-8 grundsätzlich mit der MDT aus dem interstitiellen Gewebe gewonnen werden kann und somit eine geeignete Methode für die weitere Studie von Il-8-Konzentrationen und Ischämie-Reperfusionsvorgängen in verschiedenen Organen darstellt.

4.3.3. RANTES

Die Ergebnisse zeigten bezüglich der RANTES-Konzentrationen in beiden Gruppen eine parallele Entwicklung. Beide Gruppen wiesen zum Zeitpunkt 3,5 Stunden den höchsten Wert auf, wobei tendenziell höhere Werte im Lappengewebe in der Gruppe der Nichtkomplikationen zu finden waren. Bei der Auswertung der Proben zeigte sich eine deutliche Varianz der gemessenen Werte, die von Konzentrationen unterhalb der Nachweisbarkeit bis weit oberhalb des ELISA-Standards reichten. Deshalb und aufgrund der geringen Patientenzahl ist nicht auszuschließen, dass die gemessenen Konzentrationen nicht den tatsächlichen RANTES-Konzentrationen im Muskelgewebe entsprechen. Somit können wir keine Aussage bezüglich der Beteiligung von RANTES an Ischämie-Reperfusionsvorgängen treffen.

RANTES spielt eine Rolle bei chronischen und akuten Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen [124] und führt beispielsweise nach Herztransplantationen zur Intimaverdickung der kardialen Gefäße [149]. RANTES ist in großen Mengen in Thrombozytengranula enthalten [72]. Es ist somit möglich, dass es in einer inflammatorischen Situation über eine Thrombozytenaktivierung und – vermehrung zu einer Freisetzung von RANTES kommt und somit konsekutiv zu einer Rekrutierung von T-Lymphozyten und Leukozyten [27]. Auch bei Patientinnen mit rezidivierenden spontanen Aborten finden sich abweichende RANTES-Konzentrationen – in diesem Fall geringer als bei fertilen Patientinnen. Abhängig von der Konzentration werden Lymphozytenreaktionen gehemmt und über Bcl-2 und Kaspase-abhängige Mechanismen die T-Zell-Apoptose erhöht. Folglich

könnte RANTES einen neuen blockierenden Faktor und Marker darstellen, der eine erfolgreiche Behandlung dieser Patientinnen darstellt [116]. Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der RANTES-Konzentration und einer Aktivierung von T-Zellen nutzen Adler et al. bei der Betrachtung von 4P1 murinen Mamma-Carcinom-Zelllinien. Beide Zelllinien unterschieden sich in der exprimierten Konzentration des Faktors. Die mit der geringeren Sekretion führten zu einer ausgeprägteren Infiltration des Tumors und der nächsten Lymphknotenstation mit Lymphozyten. Darüber hinaus war die Wachstumsrate dieser Tumoren deutlich geringer als derjenigen mit hohen RANTES-Konzentrationen [1].

Unsere Schwierigkeiten beim Nachweis von RANTES mittels MDT könnten rein physikalische Gründe haben (Konformationsänderung, Reaktion mit kleineren Peptiden, die akzidentiell mitdialysiert wurden, schnelle Zerfallszeit, Anfälligkeit gegenüber Kälte). Es ist beschrieben worden, dass RANTES Aggregate bildet, die wahrscheinlich sogar essentiell für die Rekrutierung von Leukozyten in Entzündungsprozessen sind. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass RANTES bei hohen und bei niedrigen Konzentrationen jeweils unterschiedliche Reaktionswege triggert, die beide einen Einfluss auf die Kalziumkonzentration und somit den Aktivierungsprozess von Lymphozyten haben [4]. Des Weiteren ist auch möglich, dass erhöhte RANTES-Konzentrationen vor allem bei inflammatorischen Prozessen zu finden sind und weniger in primär rein hypoxischen Situationen.

4.4. Ischämie-Reperfusionsvorgang

In den letzten Jahren nahm nicht nur das Interesse an pathophysiologischen Vorgängen während der Gewebeischämie, sondern auch an den immunologischen Reaktionen bezüglich der Ischämie-Reperfusionsvorgänge zu. Es gibt eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Ischämiephase und der Unterscheidung zwischen venöser und arterieller Beeinträchtigung den Gefäßanastomose bei freien Lappentransplantationen beschäftigten.

May und Kollegen beschrieben, dass nach prolongierter Ischämiezeit keine Füllung des venösen Gefäßsystems detektiert werden konnte, obwohl eine arterielle Pulsation erkennbar war. Diese beschriebene Obstruktion des Blutflusses ohne die direkte Beteiligung eines Anastomosenproblems wurde als „No-Reflow“-Phänomen bezeichnet [92]. Die bisherigen Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass es sich um zwei konkurrierende Vorgänge während der Reperusionsphase handelt, die in Kombination zu einer Gewebeschädigung im Sinne des „No-Reflow“-Phänomens führen und in der Literatur auch als „Reflow“-Paradoxon beschrieben werden [93]. Die mikrovaskuläre Minderversorgung des Gewebes führt zum einen lokal zu der bereits vorher ausführlich beschriebenen Beeinträchtigung des

Zellstoffwechsels und konsekutiv zu einem Zelltod und Gewebenekrose. Systemisch kommt es andererseits zu einer Aktivierung des Immunsystems. Die immunologische Reaktion im Gewebe ist jedoch von der Gewebepfusion abhängig und führt nach der Anastomosenöffnung zu einer weiteren Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels. May et al. machten im Wesentlichen folgende Vorgänge dafür verantwortlich: Sie zeigten, dass eine verlängerte Ischämiezeit zu einer vermehrten Thrombozytenaggregation führt, Gefäßleckagen erhöht und die Perfusion des Muskelgewebes vermindert. Die Blutflußstagnation führt zu einem intravaskulären Flüssigkeitsverlust und es kommt zu einer pH-Wert-Änderung [49]. Dieses bewirkt anschließend eine Thromboseformation durch Sludgebildung der Thrombozyten. Die verminderte Sauerstoffversorgung des Muskelgewebes führt zu einem Versagen der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe der Endothelzellen und konsekutiv zu einem Flüssigkeitseinstrom [78]. Dies hat im weiteren Verlauf eine Schwellung der Endothelzellen bis hin zum Verlust einzelner Zellen zur Folge, was wiederum zu einer weiteren Verminderung der Durchblutung und zur Gefäßleckage führt [40].

Für das kapilläre Perfusionsversagen nach Ischämie-Reperfusion wurden bisher mehrere pathophysiologische Vorgänge verantwortlich gemacht: 1. Thrombosen der Kapillaren, 2. Leukozytenaggregation mit nachfolgender Verminderung der Perfusion als eine Art „Verstopfung“ der Gefäße, 3. Endothelzellschwellung, 4. Veränderung der Blutzusammensetzung, 5. Erhöhung des hydrostatischen Widerstandes [94]. Die beiden ersten Punkte werden dabei in der Literatur kontrovers diskutiert. Quinones-Baldrich et al. beschreiben vermehrte mikrovaskuläre Thrombosen nach Ischämie-Reperfusion und propagieren eine therapeutische Fibrinolyse während der ersten Reperfusionphase. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten keine vermehrte Thrombenbildung nachgewiesen werden und auch eine Therapie mit Heparin oder Prostaglandin E1 konnten eine Perfusionseinschränkung nach Ischämie-Reperfusion nicht verhindern [95, 123]. Bagge und Kollegen postulierten erstmalig eine Aggregation von Leukozyten in den Kapillaren des Muskelgewebes als Grund für eine Schädigung nach Ischämie-Reperfusion [6]. Schmid-Schönbein führte diesen Gedanken weiter und vertrat die Ansicht, dass in Stasesituationen und durch vermehrt inflammatorisch wirkende Faktoren Granulozyten in den Kapillaren haften bleiben und so zur weiteren Schädigung beitragen [127]. Dennoch konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, ob diese Leukozytenadhäsion feste Verbindungen zum Endothel aufwies, sondern stellten sich eher als flottierende Aggregate dar. Die letzten drei Punkte werden weiterhin als mögliche Mediatoren für die Ausbildung des „No-Reflow“-Phänomens gesehen. Endothelzellschwellung kann durch Beeinträchtigung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe (wie

bereits von May et al. beschrieben) oder auch durch den Versuch, den Zell- und Umgebungs-pH konstant zu halten, verursacht sein [19]. Mehrere Autoren haben beschrieben, dass die Zellschwellung besonders nach Reperfusion ausgeprägt zu finden war und eine Affektion des Gefäßlumens stattfand, welche den Blutfluss durch eine Steigerung des Widerstandes beeinflusste [43]. Eine sowohl durch Veränderungen des Ionen- und Flüssigkeitshaushaltes hervorgerufene Veränderung der Blutviskosität als auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität trägt zu einer Beeinträchtigung der mikrovaskulären Gewebeversorgung bei [48]. Weiterhin wurde von Slaaf und Kollegen gezeigt, dass nach Stillstand der Blutzirkulation ein erhöhter Perfusionsdruck vonnöten ist, um eine Kapillarperfusion nach verlängerter Ischämiezeit zu gewährleisten [132].

Grundsätzlich gibt es drei mögliche Gründe für eine Nekrose nach Muskeltransplantation: 1. Der Lappen ist im Vergleich zur Gefäßversorgung zu groß gewählt, was zu einer distalen Nekrose im Bereich der sogenannten letzten Wiese führt. 2. Versagen des arteriellen Zustromes. 3. Versagen des venösen Abstromes. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass eine venöse Beeinträchtigung des Gefäßsystems nachteiliger für das Überleben von Muskeltransplantaten ist als eine Einwirkung auf das arterielle System. Dabei konnte bisher nicht verifiziert werden, ob es sich um unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen handelt. Kerrigan und Kollegen zeigten, dass bei gleicher Ischämiezeit eine arteriell verursachte Ischämie zu einer deutlich geringeren Nekroserate führt als eine venöse Ischämie [66]. Dabei verringert sich die Überlebensrate der Lappen deutlich mit steigender Ischämiezeit. Die Lappen mit venös induzierter Ischämie zeigen eine ausgeprägte Ödembildung sowie ein schweres Gewicht. Nach Ende arterieller Ischämien wird eher eine hyperämische Reaktion gesehen. Demgegenüber steht eine langsamere Perfusion nach venöser Gefäßokklusion [50]. Histologisch lassen sich bei den venös-ischämischen Lappen vermehrt Erythrozytenextravasationen, Fibrinbildung und Mikrothrombenbildungen erkennen. [66]. Wahrscheinlich sind auch akkumulierte Stoffwechselabbauprodukte mit lokal zytotoxischer Wirkung verantwortlich für die genannten Effekte.

4.5. Klinische Relevanz

Bisher sind die einzelnen pathophysiologischen Vorgänge, die zum „No-reflow“-Phänomen führen, nicht ausreichend geklärt. Die signifikant erhöhten C3a-Konzentrationen im Lappengewebe nach prolongierter Ischämiezeit deuten auf eine Beteiligung des Komplementsystems mit nachfolgender Gewebeschädigung hin. Eine Inhibierung des Komplementsystems und speziell C3a würde also die Effekte von ROS, PAF,

Neutrophilenaktivierung und Neutrophilenmigration reduzieren. Somit können nachfolgende Beeinträchtigungen der Zellfunktionen und mögliche Nekrosebildung minimiert und die Überlebensrate von freien myokutanen Gewebetransplantationen weiter erhöht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass löslicher rekombinanter Komplementrezeptor 1 (sCR1) die Entstehung von C3a um zwei Drittel und die Entstehung von C5a komplett verhindern kann [77]. sCR1 ist ein polymorphes Protein, welches therapeutisch bei inflammatorischen Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Myasthenia gravis und experimenteller allergischer Reaktionen im Tiermodell eingesetzt werden kann und vermutlich eine Rolle in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen spielt. Zudem konnten Heijnen et al. darstellen, dass die Gabe eines C1-Inhibitor die Konzentration von C3a, C5a, MAC und CRP reduzieren kann und somit Ischämie-Reperfusionsschäden vermindert auftraten [51]. Dies ist eine Beobachtung, die auch von anderen Arbeitsgruppen unterstützt wird [15]. K-76COON ist ein antikomplementärer Faktor auf Ebene der C5-Aktivierung. Allein oder in Kombination mit dem Protease-Inhibitor FUT-175 kann er nachweislich Ischämie-Reperfusionsschäden in der Darmschleimhaut vermindern [113]. Dabei wird der alternative Aktivierungsweg fast vollständig und der klassische Aktivierungsweg um 50-60% geblockt [69]. Alle diese Faktoren sind jedoch unspezifische antikomplementäre Agenzien. Demgegenüber steht ein spezifischer C3a-Rezeptor-Antagonist, der selektiv C3a-Rezeptoren blockieren kann: N(2)-[(2,2-diphenylethoxy)acetyl]-L-arginine (SB 290157). Somit wird die Bereitstellung von präformierten Rezeptoren durch eine Blockierung der Rezeptorinternalisierung verhindert und das Neutrophilenrekrutment unterbunden [3].

In der Pathophysiologie nach Ischämie-Reperfusion sind neben dem Komplementsystem mit Sicherheit zusätzliche Faktoren involviert. Augenscheinlich spielt es jedoch eine zentrale Rolle. Wir müssen davon ausgehen, dass C3a nicht der einzige immunologische Faktor des Komplementsystems ist, der an diesen Prozessen beteiligt ist. Die Weiterentwicklung der Mikrodialysetechnik zu Kathetern mit einer Dialysefähigkeit von Substanzen von bis zu 100 kDa erlaubt ein Monitoring von beispielsweise C5a, TNF- α , Interleukin-1 und -6 und anderen. Sie stellt eine Möglichkeit dar, die pathophysiologischen Vorgänge während und nach Ischämie-Reperfusionprozessen *in situ*, am Menschen und im klinischen Alltag zu beurteilen und bietet somit eine Hilfe zur Entwicklung von therapeutischen Strategien um Gewebeuntergang nach freien myokutanen Lappentransplantationen zu verhindern

5. Zusammenfassung

Die freie myokutane Gewebetransplantation ist eine anerkannte rekonstruktive chirurgische Technik zur Therapie ausgedehnter Weichteildefekte vor allem der unteren Extremität. Trotz der Weiterentwicklung und Sicherung der prä- und postoperativen Maßnahmen handelt es sich dabei um eine Technik mit zahlreichen Risiken. Dass ein Ischämie-Reperfusion-Schaden zum „No-Reflow“-Phänomen führen kann, ist unbestritten. Dennoch sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen spekulativ.

Die Transplantationen von freien myokutanen Latissimus Dorsi-Lappen und freie Radialislappen bieten als elektive und autologe Transplantationsmodelle im klinischen Alltag die Möglichkeit Ischämie-Reperfusionsvorgänge gezielt zu analysieren. Mit der Mikrodialysetechnik ist es bereits seit längerer Zeit möglich, metabolische Parameter wie Glukose, Laktat, Pyruvat und Glyzerol als Marker der Perfusion zu untersuchen. Darüber hinaus können jegliche Substanzen mit einer maximalen Größe von 20 kDa gemessen werden. Wir nutzten diese Voraussetzungen, um metabolische und erstmals immunologische Substanzen nach freien Gewebetransplantationen zu messen und Aufschlüsse über die Prozesse während des Ischämie-Reperfusionsvorganges zu erhalten.

Dazu wurden 19 Patienten mit Hilfe der Mikrodialysetechnik überwacht und 18 freie myokutane Latissimus Dorsi-Lappen sowie ein freier Radialislappen zur Rekonstruktion der unteren Extremität benutzt. Jeweils ein Katheter wurde im Lappengewebe und ein Katheter in gesundem Referenzgewebe platziert. Wir haben sowohl die Konzentrationen biochemischer Substanzen wie Glukose, Laktat, Pyruvat und Glyzerol analysiert, als auch erstmals die immunologischen Substanzen wie C3a, Interleukin-8 und RANTES. Die Proben wurden sowohl während der Ischämiezeit als auch bis mindestens 18 Stunden post reperfusioem in 90 Minuten-Intervallen gewonnen. Abhängig vom Auftreten von intra- und postoperativen Komplikationen konnten wir die Patienten in die beiden Gruppen A (ohne Komplikationen) und B (mit Komplikationen) einteilen.

Alle freien Lappentransplantate heilten ohne größeren Gewebeverlust ein. Auftretende Komplikationen wie Hämatome oder Thrombusformationen führten zu intra- oder postoperativen Revisionen der mikrovaskulären Anastomose und verlängerten die totale Ischämiezeit in der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe A signifikant ($P < 0,05$). Wir konnten nur punktuell signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen der metabolischen Parameter während der Reperfusion in beiden Gruppen feststellen. Interleukin-8 und C3a konnten in beiden Gruppen A und B mit Hilfe der Mikrodialysetechnik detektiert werden, während dies für RANTES nicht möglich war. Für beide Gruppen A und B konnten im

Lappengewebe höhere C3a-Konzentrationen im Vergleich zum Referenzgewebe bestimmt werden. In der Gegenüberstellung der Gruppen A und B konnten für die ersten 90 Minuten nach Reperfusion signifikant erhöhte C3a-Konzentrationen für die Gruppe mit Komplikationen gezeigt werden ($P < 0,001$).

Die vorliegende Arbeit konnte somit erstmals zeigen, dass die Mikrodialyse eine geeignete Technik für die Detektion immunologischer Substanzen während des Ischämie-Reperfusionsvorganges ist. Im Gegensatz zu bisherigen Studienergebnissen halten wir jedoch die Mikrodialysetechnik als alleiniges Monitoringverfahren zur postoperativen Überwachung nach freier Gewebetransplantation für nicht geeignet. Die metabolischen Parameter und im Speziellen der oft zitierte Laktat/Pyruvat-Quotient zeigten nicht die erwarteten, von der Ischämiedauer und dem Auftreten von Komplikationen abhängigen Konzentrationsänderungen. Einzig C3a scheint ein hochsensitiver Indikator für Ischämie-Reperfusionsschäden zu sein und ist hinweisend für eine Beteiligung des Komplementsystems während dieser Prozesse.

Die Ergebnisse dieser Studie könnten dazu beitragen, die pathophysiologischen Hintergründe des „No-Reflow“-Phänomens weiter aufzuklären.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adler EP, Leken CA, Katchen NS, Kurt RA:** A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol Lett.* 2003 Dec 15;90(2-3):187-94
2. **Allen RJ, Dupin CL, Dreschnak PA, Glass CA, Mahon-Deri B:** The latissimus dorsi/scapular bone flap (the "latissimus/bone flap"). *Plast Reconstr Surg.* 1994 Dec;94(7):988-96
3. **Ames RS, Lee D, Foley JJ, Jurewicz AJ, Tornetta MA, Bautsch W, Settmacher B, Klos A, Erhard KF, Cousins RD, Sulpizio AC, Hieble JP, McCafferty G, Ward KW, Adams JL, Bondinell WE, Underwood DC, Osborn RR, Badger AM, Sarau HM:** Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *J Immunol.* 2001 May;166 (10):6341-8
4. **Appay V, Rowland-Jones SL:** RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22:83
5. **Arumugam TV, Shields IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM:** The role of complement system in ischemia-reperfusion injury. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2004 May;21(5):401-9
6. **Bagge U, Amundson B, Lauritzen C:** White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand.* 1980;180:159-63
7. **Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL:** Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin-8, a novel Cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989 Oct;84(4):1045-9
8. **Bahlmann L, Markert U, Wirtz Ch, Heringlake M, Eichler W, Schmucker P, Klaus S:** [Microdialysis as a procedure for evaluating intestinal hypoxia – an animal experiment approach]. *Biomed Tech (Berl).* 2003 Jan-Feb;48(1-2):27-30
9. **Bahlmann L, Wagner K, Heringlake M, Wirtz C, Futterer T, Schmucker P, Klaus S:** Subcutaneous microdialysis for metabolic monitoring in abdominal aortic surgery. *J Clin Monit Comput.* 2002 Jul;17(5):309-12
10. **Bengtson A, Holmberg P, Heideman M:** The ischaemic leg as a source of complement activation. *Br. J. Surg* 1987 Aug;74(8):697-700
11. **Binnert C, Tappy L:** Microdialysis in the intensive care unit: a novel tool for clinical investigation or monitoring? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002 Mar;5(2):185-8
12. **Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N:** The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem.* 1966 Nov;13(11):1057-67
13. **Bolinder J, Ungerstedt U, Arner P:** Microdialysis measurement of the absolute glucose concentration in subcutaneous adipose tissue allowing glucose monitoring in diabetic patients. *Diabetologia* 1992; 35: 1177-80
14. **Braun FM, Hoang P, Merle M, Van Genechten F, Foucher G:** Technique and indications of the forearm flap in hand surgery. A report of thirty-three cases. *Ann Chir Main.* 1985;4(2):85-97
15. **Buerke M, Pruffer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H:** Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jul;286(1):429-38

16. **Cabrera ME, Saidel GM, Kalhan SC:** A model analysis of lactate accumulation during ischemia. *J Crit Care.* 1999 Dec;14(4):151-63
17. **Cabrera ME, Saidel GM, Kalhan SC:** Lactate metabolism during exercise: analysis by an integrate system model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1999;277:1522-36
18. **Cabrera ME, Saidel GM, Kalhan SC:** Role of O₂ in regulation of lactate dynamics during hypoxia: mathematical model and analysis. *Ann Biomed Eng.* 1998 Jan-Feb;26(1):1-27
19. **Cala PM, Anderson SE, Cragoe EJ:** Na/H exchange-dependent cell volume and pH regulation and disturbances. *Comp Biochem Physiol A.* 1988;90(4):551-5
20. **Campbell W, Okada N, Okada H:** Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol Rev.* 2001 Apr;180:162-7
21. **Carlsson PO, Kiuru A, Nordin A, Olsson R, Lin JM, Bergsten P, Hillered L, Andersson A, Jansson L:** Microdialysis measurements demonstrate a shift to nonoxidative glucose metabolism in rat pancreatic islets transplanted beneath the renal capsule. *Surgery* 2002 Sept;132(3): 487-94
22. **Carrel A, Guthrie CC:** The transplantation of veins and organs. *Am Med* 1905;10:1101-2
23. **Chen Y, Hung WT, Chen SM, Tseng SH:** Suppression of elevated plasma interleukin-8 levels due to total ischemia and reperfusion of the small intestine by luminal perfusion with fetal bovine serum. *Pediatr Surg Int.* 2002 Mar;18(2-3):107-9
24. **Cheung AK, Faezi-Jenkin B, Leyboldt JK:** Effect of thrombosis on complement activation and neutrophil degranulation during in vitro hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 1994 Jul;5(1):110-5
25. **Clarkson AN, Sutherland BA, Appleton I:** The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005 May-Jun;53(3):213-25
26. **Conolly CA:** Microdialysis update: optimizing the advantages. *J Physiol* 1999 Jan 15;514 (Pt2):303
27. **Danese S, De La Motte C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C:** Cutting Edge: T-Cells Trigger CD40-Dependant Platelet Activation and Granular RANTES Release: A Novel Pathway of Immune Response Amplification. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2011-5
28. **De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddel TK, Mc Rae K, Liu M, Wigle Da, Keshavjee S:** Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 15;165(2):211-5
29. **Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, Lopez JA, Afshar-Kharghan V:** Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med.* 2005 Mar 21;201(6):871-9
30. **Delgado JM, Lerma J, Martin del Rio S, Solis JM:** Dialytrode technology and local profiles of amino acids in the awake cat brain. *J Neurochem.* 1984 May;42(5):1218-28
31. **Dodt C, Lonnroth P, Fehm HL, Elam M:** Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans. *J Physiol.* 1999 Dec 1;521 Pt 2:545-52
32. **Dodt C, Lonnroth P, Fehm HL, Elam M:** The subcutaneous lipolytic response to regional neural stimulation is reduced in obese women. *Diabetes* 2000;49:1875-9
33. **Edsander-Nord A, Rojdmarm J, Wickman M:** Metabolism in pedicled and free TRAM flaps: a comparison using the microdialysis technique. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Feb;109(2):664-73

34. **Enblad P, Frykholm P, Valtysson J, Silander HC, Andersson J, Fasth KJ, Watanabe Y, Langstrom B, Hillered L, Persson L:** Middle cerebral artery occlusion and reperfusion in primates monitored by Microdialysis and sequential positron emission Tomography. *Stroke* 2001;32:1574-80
35. **Enblad P, Valtysson J, Andersson J, Lilja A, Valind S, Antoni G, Langstrom B, Hillered L, Persson L:** Simultaneous intracerebral Microdialysis and positron emission tomography in the detection of ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Jul;16(4):637-44
36. **Enoksson S, Nordenstrom J, Bolinder J, Arner P.** Influence of local blood flow on glycerol levels in human adipose tissue. *Int J Obes* 1995;19:350-354
37. **Fellander G, Elebirt L, Borlinder J, Nordenstrom J, Arner P:** Microdialysis of adipose tissue during surgery: effect of local alpha- and beta-adrenoceptor blockade on blood flow and lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8):2919-24
38. **Fellander G, Nordenstrom J, Tjader I, Bolinder J, Arner P:** Lipolysis during abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Jan;78(1):150-5
39. **Ferreira MA:** Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. *Mediators Inflamm,* 2003 Oct;12(5):259-67
40. **Flores J DiBona DR, Beck CH, Leaf A:** The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest.* 1972 Jan;51(1):118-26
41. **Francis K, Lewis BM, Akatsu H, Monk PN, Cain SA, Scalon MF, Morgan BP, Ham J, Gaque P:** Complement C3a receptors in the pituitary gland: a novel pathway by which an innate immune molecule release hormones involved in the control of inflammation. *FASB J* 2003 Dec;17(15):2266-8
42. **Gabriel A, Chaney N, Stephenson LL, Zamboni WA:** Effect of total venous occlusion on capillary flow and necrosis in skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Aug;108(2):430-3
43. **Gidlof A, Lewis DH, Hammersen F:** The effect of prolonged total ischemia on the ultrastructure of human skeletal muscle capillaries. A morphometric analysis. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1987;7:67-86
44. **Giessler GA, Erdmann D, Germann G:** Plastische Deckung von Hautdefekten. *Der Chirurg* 3 2002; 73:290-304
45. **Guo Y, Torkvist L, Raud J, Hedqvist P:** Increased tissue survival in experimental skin flaps in mast cell-deficient rats. *Acta Physiol Scand* 2003 Dec;179(4):399-405
46. **Gutierrez A, Anderstam B, Alvestrand A:** Amino acid concentration in the interstitium of human skeletal muscle: a microdialysis study. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:947-52
47. **Hagstrom-Toft E, Enoksson S, Moberg E, Bolinder J, Arner P:** Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt 1):E584-92
48. **Hammersen F, Barker JH, Gidlöf A, Menger MD, Hammersen E, Messmer K:** The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 1989;13:1-26
49. **Hardaway RM:** Microcoagulation in shock. *Am J Surg.* 1965 Sep;110:298-301
50. **Heden P, Sollevi A:** Circulatory and metabolic events in pig island skin flaps after arterial or venous occlusion. *Plast Reconstr Surg.* 1989; (3):475-83

51. **Heijnen BH, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ, Hack CE, Van Gulik TM:** Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clin Exp Immunol.* 2006 Jan;143(1):15-23
52. **Hillered L, Persson L:** Neurochemical monitoring of the acutely injured human brain. *ScandJ Clin LabInvest Suppl.* 1999;229:9-18
53. **Hillered L, Persson L:** Theory and practice of microdialysis--prospect for future clinical use. *Acta Neurochir Suppl.* 1999;75:3-6.
54. **Hillered L:** Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using Microdialysis. *Acta Neurochir.* 1990;102(3-4):91-7
55. **Hillis GS, Terregino CA, Taggart P, Killian AJ, Mangione A:** Inflammatory cytokines provide limited early prognostic information in emergency department patients with suspected myocardial ischemia. *Ann Emerg Med.* 2003 Sep;42(3):337-42
56. **Hillyer P, Mordet E, Flynn G, Male D:** Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discrimination the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp. Immunol.* 2003 Dec;134(3):431-41
57. **Hirani N, Antonicalli F, Strieter RM, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, Haslett C, Donnelly SC:** The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages – a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med.* 2001 Oct;7(10):685-97
58. **Holzheimer RG, Steinmetz W:** Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res.* 2000 Aug 18;5(8):347-55
59. **Hugli TE:** Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure. *J Biol Chem* 1975;250(21):8293-301
60. **Hutchins EH:** A method for the prevention of elephantiasis. *Surg Gynecol Obstet.*
61. **Hutchinson PJ, O'Connell MT, Maskell LB, Pickard JD:** (1999) Monitoring by subcutaneous microdialysis in neurosurgical intensive care. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 75:57–59
62. **Isobe T, Mioura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N:** The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod* 2002 Jun;17(6):1441-6
63. **Kanthan R, Shuaib A, Griebel R, Miyashita H:** (1995) Intracerebral human microdialysis. In vivo study of an acute focal ischemic model of the human brain. *Stroke* 26:870–873
64. **Katz A, Sahlin K:** Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 1990;18:1-28
65. **Kennergren C, Mantovani V, Lonnroth P, Nystrom B, Berglin E, Hamberger A:** Monitoring of extracellular aspartate aminotransferase and troponin T by Microdialysis during and after cardioplegic heart arrest. *Cardiology* 1999;92:162-70
66. **Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J:** Global flap ischemia: A comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg.* 1994;93:1485-95
67. **Kildsgaard J, Hollmann TJ, Matthews KW, Bian K, Murad F, Wetsel RA:** Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock. *J Immunol* 2000 Nov 15;165(10):5406-9

68. **Kim YI, Song KE, Ryeon HK, Hwang YJ, Yun YK, Lee JW, Chun BY:** Enhanced inflammatory cytokine production at ischemia/reperfusion in human liver resection. *Hepatogastroenterology*. 2002 Jul-Aug;49(46):1077-82
69. **Kimura T, Andoh A, Fujiyama Y, Saotoma T, Bamba T:** A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischaemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Immunol*. 1998 Mar;111(3):484-90
70. **Klaus S, Heringlake M, Gliemroth J, Pagel H, Staubach KH, Bahlmann L:** Biochemical tissue monitoring during hypoxia and reoxygenation. *Resuscitation*. 2003 Mar;56(3):299-305
71. **Klaus S, Staubach KH, Eichler W, Gliemroth J, Heringlake M, Schmucker P, Bahlmann L:** Clinical biochemical tissue monitoring during ischemia and reperfusion in major vascular surgery. *Ann Clin Biochem* 2003 May;40(Pt3):289-91
72. **Klinger MH:** Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)*. 1997 Jul;196(1):1-11
73. **Kubala L, Ciz M, Vondracek J, Cerny J, Nemecek P, Studenik P, Cizova H, Lojek A:** Perioperative and postoperative course of cytokines and the metabolic activity of neutrophils in human cardiac operations and heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Dec;124(6):1122-9
74. **Kurdowska A, Carr FK, Stevens MD, Baughman RP, Martin TR:** Studies on the interaction of IL-8 with human plasma alpha 2-macroglobulin:evidence for the presence of IL-8 complexed to alpha 2-macroglobulin in fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *J Immunol* 1997 Feb 15;158(4):1930-40
75. **Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ:** Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained arf after ischemic injury in renal allograft. *Am J Kidney Dis*. 2003 May;41(5):1074-87
76. **Langemann H, Habicht J, Mendelowitsch A, Kanner A, Alessandri B, Landolt H et al.:** Microdialytic monitoring during a cardiovascular operation. *Acta Neurochir Suppl*. 1996;67:70-4
77. **Larsson R, Elgue G, Larsson A, Ekdahl KN, Nilsson UR, Nilsson B:** Inhibition of complement activation by soluble recombinant CR1 under conditions resembling those in cardiopulmonary circuit: reduced up-regulation of CD11b and complete abrogation of binding of PMN's to the biomaterial surface. *Immunopharmacology*. 1997 Dec;38(1-2):119-27
78. **Leaf A:** Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation*. 1973 Sep;48(3):455-8
79. **Lee LF, Louie MC, Desai SJ, Yang J, Chen HW, Evans CP, Kung HJ:** Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: differential effects of tyrosine kinase Src and FAK. *Oncogene*. 2004 Mar 18;23(12):2197-205.
80. **Lonnroth P, Jansson P-A, Fredholm BB, Smith U:** Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol* 1989;256:E250-255
81. **Lonnroth P, Smith U:** Microdialysis – a novel technique for clinical investigations. *J Intern Med*. 1990;227(5):295-300
82. **Lorenzetti F, Ahovuo J, Suominen S, Salmi A, Asko-Seljavaara S:** Colour Doppler ultrasound evaluation of haemodynamic changes in free flap flaps and their donor sites. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2002;36(4):202-6.
83. **Lu KC, Wang JY, Lin SH, Chu P, Lin YF:** Role of circulating cytokines and chemokines in exertional heatstroke. *Crit Care Med*. 2004 Feb;32(2):399-403

84. **Lucchesi BR, Tanhehco EJ:** Therapeutic potential of complement inhibitors in myocardial ischemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 May;9(5):975-91
85. **Lupia E, Del Sorbo L, Bergerone S, Emanuelli G, Camussi G, Montrucchio G:** The membrane attack complex of complement contributes to plasmin-induced synthesis of platelet-activation factor by endothelial cells and neutrophils. *Immunology* 2003;109:557-63
86. **Machens HG, Mailaender P, Reimer R, Pallua N, Lei Y, Berger A:** Postoperative blood flow monitoring after free-tissue transfer by means of the hydrogen clearance technique. *Plast Reconstruct Surg* 1997;99:493-505
87. **Machens HG, Pabst A, Dreyer M, Gliemroth J, Gorg S, Bahlmann L, Klaus S, Kaun M, Kruger S, Mailaender P:** C3a levels and occurrence of subdermal vascular thrombosis are age-related in deep second-degree burn wounds. *Surgery*. 2006 Apr;139(4):550-5
88. **Manchot C:** Die Hautarterien des menschlichen Körpers. Springer-Verlag, Leipzig, 1889
89. **Masquelet AC:** Anatomy of the radial forearm flap. *Anat Clin*. 1984;6(3):171-6
90. **Maxwell GP, Stueber K, Hoopes JE:** A free latissimus dorsi myocutaneous flap: case report. *Plast Reconstr Surg*. 1978 Sep;62(3):462-6
91. **Maxwell GP:** Inguis Tannini and the origin of the latissimus dorsi musculocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg*. 1980 May;65(5):686-92
92. **May JW, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV:** The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978 Feb;61(2):256-67
93. **Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Throlacius H, Rucker M, Vollmar B:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradoxon". *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1901-6
94. **Menger MD, Steiner D, Messmer K:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no-reflow". *Am J Physiol*. 1992;263:H1892-H1900
95. **Messina LM:** In vivo assessment of acute microvascular injury after reperfusion of ischemic tibialis anterior muscle of the hamster. *J Surg Res* 1990;48:615-21
96. **Monsinjon T, Richard V, Fontaine M:** Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001 Oct;15(5):293-306
97. **Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G:** Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1669-99
98. **Muhlbauer W, Herndl E, Stock W:** The forearm flap. *Plast Reconstr Surg*. 1982 Sep;70(3):336-44
99. **Mueller AR, Platz KP, Haak M, Undi H, Mueller C, Kottgen E, Weidemann H, Neuhaus P:** The release of cytokines, adhesion molecules and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation*. 1996;62:1118-26
100. **Muller M:** Science, medicine, and the future: Microdialysis. *BMJ*. 2002 Mar 9;324(7337):588-91
101. **Naredi S, Olivecrona M, Lindgren C, Ostlund AL, Grande PO, Koskinen LO:** An outcome study of severe traumatic head injury using the "Lund therapy" with low-dose prostacyclin. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:402-6

102. **Navegantes LCC, Sjordtrand M, Gudbjorndottir S, Strindberg L, Elam E, Lonroth P:** Regulation and counterregulation of lipolysis in vivo: different roles of sympathetic activation and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5515-20
103. **Nielsen IM; Kiil J:** The radial forearm flap. A report o two cases with antegrade and retrograde arterial and venous flow. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1985;19(3):309-12
104. **Nielsen IM; Lassen M, Gregersen BN, Krag C:** Experience with the latissimus dorsi flap. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1985;19(1):53-63
105. **Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, Saveland H:** Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemicdeterioration. *Neurosurgery* 1999;45:1176-84
106. **Nowak G, Ungerstedt J, Wernerman J, Ungerstedt U, Ericzon BG:** Clinical experience in continuous graft monitoring with microdialysis early after liver transplantation. *Br J Surg* 2002 Sep;89(9):1169-75
107. **Olivari N:** The latissimus dorsi flap. *Br J Plast Surg.* 1976 Apr;29(2):126-8
108. **Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA:** Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(3):785-8
109. **Oz MC, Liao H, Naka Y, Seldomridge A, Becker DN, Michler RE, Smith CR, Rose EA, Stern DM, Pinsky DJ:** Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation. A potential role for endothelial cells. *Circulation* 1995;92:428-432
110. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN:** Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery.* 1983 Sep;94(3):428-32
111. **Pease JE, Sabroe I:** The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am J Respir Med.* 2002;1(1):19-25
112. **Persson L, Hillered L:** Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. *J Neurosurg* 1992;76:72-80
113. **Proctor LM, Arumugam TV, Shiels I, Reid RC, Feirlie DP, Taylor SM:** Comparative antiinflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2004 Jun;142(4):756-64
114. **Qi X, Li S, Li J:** The prognostic value of IL-8 for cardiac events and restenosis in patients with coronary heart disease after percutaneous coronary intervention. *Jpn Heart J* 2003 Sep;44(5):623-32
115. **Rainer C, Schwabegger AH, Bauer T, Ninkovic M, Klestil T, Harpf C, Ninkovic MM:** Free flap reconstruction of the foot. *Ann Plast Surg.* 1999 Jun;42(6):595-607
116. **Ramhorst RE, Garcia VE, Corigliano A, Rabinovich GA, Fainboim L:** Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the maternal allogeneic response. *Clin Immunol.* 2004 Jan;110(1):71-80
117. **Ratajczak J, Reza R, Kucia M, Majka M, Allendorf DJ, Baran JT, Janowska-Wieczorek A, Wetsel RA, Ross GD, Ratajczak MZ:** Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a-receptor (C3aR) reveal a novel for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood.* 2003 Nov 6

118. **Rizell M, Naredi P, Lindner P, Hellstrand K, Jansson PA:** Validation of the internal reference technique for Microdialysis measurements of interstitial histamine in the rat. *Life Sci* 1999;65(17):1765-71
119. **Rojdmark J, Heden P, Ungerstedt U:** Microdialysis – a new technique for free flap surveillance: Methodological description. *Eur J Plast Surg.* 1998;21:344-8
120. **Rojdmark J, Heden P, Ungerstedt U:** Prediction of border necrosis on skin flaps of pigs with microdialysis. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16:129-34
121. **Rojdmark J, Ungerstedt J, Blomqvist L, Ungerstedt U, Heden P:** Comparison of the metabolism during ischemia and reperfusion in free flaps of different tissue composition. Doctoral thesis from the Department of Reconstructive Plastic Surgery, Karolinska Hospital: Microdialysis in reconstructive Surgery, Stockholm 2000
122. **Rosdahl H, Hamrin K, Ungerstedt U, Hendriksson J:** Metabolite levels in human skeletal muscle and adipose tissue studied with microdialysis at low perfusion flow. *Am J Physiol.* 1998;E936-45
123. **Rosolowsky M, Weiss HR:** Effect of blood coagulation and platelet aggregation on perfusable capillaries and arterioles in ischemic and nonischemic myocardium. *Microvasc Res.* 1987;34:69-83
124. **Ruster M, Sperschneider H, Funfstuck R, Stein G, Grone HJ:** Differential expression of betachemokines MCP-1 and RANTES and their receptors CCR1, CCR2, CCR5 in acute rejection and chronic allograft nephropathy of human renal allografts. *Clin Nephrol* 2004 Jan;61(1):30-9
125. **Salmi A, Tuominen R, Tukiainen E, Asko-Seljavaara S:** Morbidity of donor and recipient sites after free flap surgery. A prospective study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1995 Dec;29(4):337-41
126. **Salmon M:** *Les Artères de la peau.* Masson, Paris, 1936
127. **Schmid-Schonbein GW:** Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in he microcirculation. *Federation Proc.* 1987;46:2397-401
128. **Schoeller T, Huemer GM, Otto-Schoeller A, Wechselberger G, Piza-Katzer H:** [Endoscopically-assisted latissimus dorsi muscle harvest in a young child]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2003 Jul;35(4):259-62
129. **Serrick C, Adoumie R, Giaid A, Shennib H:** The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation* 1994;58:1158-62
130. **Settmacher B, Rheinheimer G, Hamacher H, Ames RS, Wise A, Jenkinson L, Bock D, Schaefer M, Kohl J, Klos A:** Structure-function studies of the C3a-receptor: G-terminal serine and threonine residues which influence receptor internalization and signalling. *Eur J Immunol.* 2003 Apr;33(4):920-7
131. **Sim RB, Tsiftoglou SA:** Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans.* 2004 Feb;32(Pt1):21-7
132. **Slaaf DW, Reneman RS, Wiederhielm CA:** Cessation and onset of muscle capillary flow at simultaneously reduced perfusion and transmural pressure. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1987;6:215-24
133. **Stainsby WN, Brooks GA:** Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 1990;18:29-63
134. **Straatsburg IH, Boormeester MA, Wolbink GJ, van Gulik TM, Gouma DJ, Frederiks WM, Hack CE:** Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans : a study in patients undergoing partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2000 May;32(5):783-91

135. **Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P:** RANTES production by memory phenotyp T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependant process. *Immunity* 2002 Nov;17(5):605-15
136. **Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello Ca, Burke JE, Gelfand JA:** A new biologic role for C3a and C3a des Arg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3455-60
137. **Tylman A, Bengtson JP, Bengtsson A:** Activation of the complement system by different autologous transfusion devices: an in vitro study. *Transfusion* 2003;43(3):395-9
138. **Udesen A, Lontoft E, Kristensen SR:** Monitoring of free TRAM flaps with microdialysis. *J Reconstr Microsurg.* 2002 Feb;16(2):101-6
139. **Ungerstedt J, Nowak G, Ericzon BG, Ungerstedt U:** Intraperitoneal Microdialysis (IPM): a new technique for monitoring intestinal ischemia studied in a porcine model. *Shock.* 2003 Jul;20(1):91-6
140. **Ungerstedt U:** Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1990;230:365-73
141. **Van Beek J, Bernaudin M, Petit E, Gasque P, Nouvelot A, Mac Kenzie ET, Fontaine M:** Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemie in the mouse *Exp Neurol* 2000 Jan;161(1):373-82
142. **Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggolini M:** Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149:755-761
143. **Walzer T, Marcais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, Marvel J:** Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol* 2003 Feb 15;170(4):1615-9
144. **Wang HC, Zhang H, Zhou TL:** Protective effect of hydrophilic Salvia monomer on liver ischemia/reperfusion injury induced by pro-inflammatory cytokines. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He ZaZhi.* 2002 Mar;22(3):207-10
145. **Werfel T, Kirchoff K, Wittmann M, Begemann G, Kapp A, Heidenreich F, Gotze O, Zimmer J:** Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J Immunol* 2000 Dec 1;165(11):6599-605
146. **Wyble EJ, Yakuboff KP, Clark RG, Neale HW:** Use of free fasciocutaneous and muscle flap for reconstruction of the foot. *Ann Plast Surg.* 1990 Feb;24(2):101-8
147. **Xu L, Pathak PS, Fukumura D:** Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):701-7
148. **Yasuda M, Takeuchi K, Hiruma M et al:** The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* 1990;81:156-63
149. **Yun JJ, Whiting D, Fischbein MP, Banerji A, Irie Y, Stein D, Fishbein MC, Proudfoot AEI, Laks H, Berliner JA, Ardehali A:** Combined blockade of the chemokine Receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection. *Circulation.* 2004 Feb 24;109(7):932-7

7. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen Personen, die maßgeblich Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit hatten:

Prof. Dr. H.G. Machens für die Überlassung des Themas und die persönliche Betreuung, sowie dem Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit. Ihm gebührt großen Dank für die Möglichkeit, Teile der Arbeit mündlich und schriftlich zu präsentieren.

Der gesamten Abteilung für Plastische Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck für die Unterstützung. Im Besonderen: Prof. Dr. med. P. Mailänder für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut durchführen zu können. Dr. med. A. Noltze, Dr. med. M. Kaun, Dr. med. S. Grzybowski und dem pflegerischen Team der Verbrennungseinheit 23v für die tatkräftige Unterstützung während der Probengewinnung.

Frau I. Jasmund und Frau K. Witting für die gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, PD Dr. med. S. Görg und der Frau K. Kropf für die tatkräftige, engagierte Hilfe in der experimentellen Durchführung und der anschließenden Auswertung.

PD Dr. med. J. Gliemroth und Frau Dr. med. A. Klöhn aus der Klinik für Neurochirurgie, die mir zur Auswertung der metabolischen Parameter den MD-Analyser zur Verfügung gestellt und bei technischen Geräteschwierigkeiten geholfen haben.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Geschwistern Laura und Matti, meinen Eltern Elke und Helmut und meinem Mann Norbert für das Anfeuern und den Beistand.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne Brüggemann, geb. Pabst
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Helmut Pabst; Dozent, Dekra Medienakademie Berlin
Elke Pabst; Lehrerin, Gymnasium Dorf Mecklenburg

Schulbildung

07/1999 Abitur, Gymnasium Dorf Mecklenburg
06/1997 Graduation, Hamilton High School, Hamilton, Montana, USA

Hochschule

10/1999 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
10/2001 Ärztliche Vorprüfung
09/2002 1. Staatsexamen
09/2004 2. Staatsexamen
11/2005 3. Staatsexamen
01/2002 – 01/2005 klinische und experimentelle Datenerhebung der Doktorarbeit

Klinische Tätigkeit

Seit 01/2006 Assistenzärztin in der Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

9. Publikationen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit entstandene Originalarbeiten

Machens HG, **Pabst A**, Dreyer M, Gliemroth J, Gorg S, Bahlmann L, Klaus S, Kaun M, Kruger S, Mailänder P: C3a levels and occurrence of subdermal vascular thrombosis are age-related in deep second-degree burn wounds. *Surgery*. 2006 Apr;139(4):550-5

Brüggemann A, Noltze A, Lange T, Kaun M, Gliemroth J, Görg S, Bahlmann L, Klaus S, Siemers F, Mailänder P, Machens HG: [C3a] is significantly increased in free flaps after prolonged ischemia-reperfusion injury. Eingereicht bei *Surgery*. September 2006

Im Rahmen dieser Doktorarbeit gehaltene Vorträge

Pabst A, Dreyer M, Noltze A, Siemers F, Dreimann V, Battermann R, Schlichter M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Die Mikrodialyse als neues Verfahren zum Monitoring metabolischer und immunologischer Parameter in thermisch geschädigtem Gewebe. 21. Tagung der DAV in Kitzbühel/Österreich am 07.01.2003

Pabst A, Noltze A, Battermann R, Grzybowski S, Köbe H, Kaun M, Schlichter M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Use of the microdialysis technique for monitoring of immunologic and biochemical changes in free microvascular tissue transplants. 7th ECSAPS Meeting in Genf am 19.09.2003

Pabst A, Noltze A, Battermann R, Grzybowski S, Köbe H, Kaun M, Schlichter M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Monitoring biochemischer und immunologischer Veränderungen in freien mikrovaskulären Gewebetransplantaten mit Hilfe der Mikrodialysetechnik. 34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg am 03.10.2003

Pabst A, Kaun M, Dreyer M, Noltze A, Siemers F, Battermann R, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Microdialysis as a new tool to monitor biochemical parameters in thermally injured patients. 8. Chirurgische Forschungstage 2004 in Mannheim am 29.10.2004

Brüggemann A, Noltze A, Kaun M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: C3a is significantly increased in free flaps after prolonged ischemia-reperfusion injury. 9. Chirurgische Forschungstage 2005 in Frankfurt/Main am 20.09.2005

Brüggemann A, Noltze A, Kaun M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Metabolische und immunologische Veränderungen in freien Lappen nach verlängerter Ischämie-Reperfusionszeit. 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2006 in Berlin am 04.05.2006

Publizierte Abstracts

Pabst A, Noltze A, Grzybowski S, Köbe H, Kaun M, Schlichter M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Monitoring biochemischer und mikrozirkulatorischer Veränderungen in freien mikrovaskulären Gewebetransplantaten mit Hilfe der Mikrodialysetechnik. *Plastische Chirurgie* 3 (Suppl.1):29 (2003)

Kaun M, **Pabst A**, Dreyer M, Noltze A, Siemers F, Battermann R, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Microdialysis as a new tool to monitor biochemical parameters in thermally injured patients. *Langenbeck's Arch Surg* 389: 445-6 (2004)

Brüggemann A, Noltze A, Kaun M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: C3a is significantly increased in free flaps after prolonged ischemia-reperfusion injury. *Langenbeck's Arch Surg* 390: 454 (2005)

Brüggemann A, Noltze A, Kaun M, Görg S, Gliemroth J, Mailänder P, Machens HG: Metabolische und immunologische Veränderungen in freien Lappen nach verlängerter Ischämie-Reperfusionzeit [C3a is significantly increased in free flaps after prolonged ischemia-reperfusion injury] *Chirurgisches Forum* 2006, Band 35: 387-9

Vortragspreis

10/2004 H. J. Bretschneiderpreis 2004 der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie,
Sektion Chirurgische Forschung e.V.